

Contribution à l'étude histochimique
des granulations des basophiles
du tissu conjonctif et du sang
Les différents degrés de la synthèse de l'héparine
et de ses dérivés, et son comportement dans
divers états pathologiques, et au cours
d'agressions expérimentales.

Travail du Laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine

THESE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

LE 23 JUILLET 1955

PAR

LOUIS KHAU VAN KIEN

Docteur d'Etat en Pharmacie

Licencié ès Sciences

(Biologie générale, Zoologie générale, Chimie générale, Minéralogie)

Œnologue

Certifié d'études supérieures de Bromatologie

Diplômé de Médecine exotique

Lauréat de la Faculté de médecine et de la Faculté de pharmacie

Chargé de recherches au C.N.R.S.

Né le 6 Mai 1913 à TRAVINH (Vietnam)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examineurs de la Thèse	{	MM. J. TURCHINI, professeur, <i>Président.</i>	{	<i>Assesseurs.</i>
		F. GRANEL, professeur		
		P. CAZAL, professeur		
		C. BÉNÉZECH, professeur		

MONTPELLIER

IMPRIMERIE PAUL DEBAN

Contribution à l'étude histochimique
des granulations des basophiles
du tissu conjonctif et du sang

Les différents degrés de la synthèse de l'héparine
et de ses dérivés, et son comportement dans
divers états pathologiques, et au cours
d'agressions expérimentales.

Travail du Laboratoire d'Histologie de la Faculté de Médecine

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de Montpellier

LE 23 JUILLET 1955

PAR

LOUIS KHAU VAN KIEN

Docteur d'Etat en Pharmacie
Licencié ès Sciences

(Biologie générale, Zoologie générale, Chimie générale, Minéralogie)
Enologie

Certifié d'études supérieures de Bromatologie

Diplômé de Médecine exotique

Lauréat de la Faculté de médecine et de la Faculté de pharmacie
Chargé de recherches au C.N.R.S.

Né le 6 Mai 1913 à TRAVINH (Vietnam)

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Examineurs de la Thèse	{	MM. J. TURCHINI, professeur, <i>Président.</i>	{	<i>Assesseurs.</i>
		F. GRANEL, professeur		
		P. CAZAL, professeur		
		C. BÉNÉZECH, professeur		

MONTPELLIER
IMPRIMERIE PAUL DEHAN



PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Professeurs honoraires

MM. GALAVIELLE, VILLARD, GRINFELT, L. RIMBAUD, BOUDET,
EUZIÈRE, *doyen honoraire*, J. DELMAS, MARGAROT.

Professeurs

Chaires

Anatomie	MM. LAUX.
Histologie	TURCHINI, <i>assesseur</i> .
Physiologie	HÉDON.
Physiologie appliquée	LOUBATIÈRES.
Chimie biologique médicale et toxicologie.....	CRISTOL.
Physique médicale.....	PEGH.
Anatomie pathologique et médecine expérimentale..	BAUMEL.
Microbiologie	CARRÈRE.
Hist. naturelle méd., parasitol. et méd. exotique...	HARANT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	PAGÈS.
Thérapeutique et clinique des maladies infectieuses...	JANBON.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	BERT.
Hygiène	CARRIEU.
Médecine légale et médecine sociale.....	FOURCADE.
Technique opératoire et chirurgie expérimentale...	LAPEYRIE.
Pathologie et clinique propédeutique chirurgicales....	MOURGUE-MOLINES.
Pathologie et clinique propédeutique médicales.....	PUECH.
Clinique médicale	GIRAUD, <i>doyen</i> .
—	BOULET.
Clinique chirurgicale.....	LAPEYRE.
—	AIMES.
Clinique obstétricale.....	CADERAS DE KERLEAU.
Clinique des maladies mentales et nerveuses.....	LAFON.
Clinique des maladies des enf. et hyg. du 1 ^{er} âge.....	CHAPTAL.
Clinique de dermatologie et syphiligraphie.....	P. RIMBAUD.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	ETIENNE.
Clinique urologique.....	TRUC.
Clinique gynécologique.....	ROUX.
Clinique ophtalmologique.....	DEJEAN.
Clinique d'oto-rhino-lar. et chir. maxillo-faciale...	TERRACOL.
Clinique de la Tuberculose	VIDAL.
Electro-radiologie	LAMARQUE.

Professorat à titre personnel

Histologie	GRANEL.
------------------	---------

Professeurs sans chaire

Pathologie médicale.....	BOUCOMONT.
Chimie et physico-chimie biologiques.	BÉNÉZECH.
Hématologie médicale et anatomie pathologique. ..	CAZAL.

Maîtres de conférences agrégés et agrégés en exercice

MM.	MM.
Anatomie..... GUERRIER,	Chirurgie..... JOYEUX, <i>agr.</i>
<i>m. de c. agr.</i>	— NÈGRE, <i>agr.</i>
Microbiologie..... RENOUX <i>m. de c. agr.</i>	— ROMIEU, <i>agr.</i>
Pathol. expérim..... PASSOUANT, <i>m. de c. agr</i>	Electro-Radiologie.. BÉTOULIÈRES.
Médecine..... SERRE,	Neuro-chirurgie..... GROS, <i>agr.</i>
— BALMÈS,	Obstétrique..... DURAND, <i>agr.</i>
— BERTRAND,	Ophtalmologie..... VIALLEFONT, <i>agr.</i>
— LATOUR,	Odonto-stomat..... N...
— N...	

Chargé de cours à titre permanent

Propédeutique médicale.....	COLL DE CARRERA, <i>agrégé libre</i> .
-----------------------------	---

Enseignements complémentaires

Des conférences annexes régulières renforcent l'enseignement de base de ces diverses disciplines. D'autres assurent des enseignements complémentaires (embryologie, sérologie, chirurgie de la tuberculose, clinique gastro-entérologique, cardiologie, médecine exotique, anesthésiologie, odonto-stomatologie, médecine du travail, biologie de l'éducation physique, etc...).

A MA FEMME ET A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A MES AMIS

A NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TURCHINI,
Président

MONSIEUR LE PROFESSEUR F. GRANEL,

MONSIEUR LE PROFESSEUR P. CAZAL,

MONSIEUR LE PROFESSEUR C. BENEZECH,

A tous nos Maîtres de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux de Montpellier, nous exprimons très sincèrement nos sentiments de profonde et déférente gratitude pour les enseignements et les conseils bienveillants qu'ils n'ont cessé de nous témoigner au cours de nos études médicales.

A NOS MAITRES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TURCHINI,

Professeur d'Histologie

Directeur des recherches du Laboratoire d'Histologie

qui nous a inspiré ce travail et qui toujours avec une affection toute paternelle, nous a guidé dans la recherche scientifique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR F. GRANEL,

Professeur d'Histologie

qui a toujours été bienveillant à notre égard, et qui nous a fait participer à ses recherches ; nous le prions d'agréer l'expression de notre respectueuse gratitude.

A TOUS NOS AMIS

Chercheurs et Personnel du Laboratoire d'Histologie

Contribution à l'étude histochimique des granulations des basophiles du tissu conjonctif et du sang. Les différents degrés de la synthèse de l'héparine et de ses dérivés et son comportement dans divers états pathologiques et au cours d'agressions expérimentales.

INTRODUCTION

De très nombreuses incertitudes règnent encore quant à la nature et au rôle des granulations des basophiles du tissu conjonctif et du sang.

C'est pour cette raison que sur les conseils et sous la direction de mon Maître, Monsieur le professeur J. TURCHINI, j'ai entrepris l'étude de ces éléments.

Nous envisageons d'examiner le problème posé par la synthèse héparinique dans les mastocytes et les basophiles du sang.

J'apporterai, grâce à des méthodes histochimiques nouvelles, une preuve de l'élaboration de l'héparine et des dérivés au niveau des granulations basophiles.

J'étudierai le comportement des basophiles dans les états pathologiques et au cours d'agressions expérimentales pour essayer de préciser le rôle des granulations basophiles dans l'organisme.

Enfin je dégagerai de leur comportement le lien de parenté qui existe entre les éléments du sang et ceux des tissus.

I

GÉNÉRALITÉS

La substance basophile caractérisée par son affinité pour les colorants basiques existe dans bien des cellules et comprend des substances diverses. On l'a trouvée dans les hématies ponctuées, dans le cytoplasme des cellules en croissance, dans l'ergastoplasme des cellules pancréatiques, dans les granulations des mastocytes. Ces substances, qu'un point commun réunit, leur basophilie, ont des constitutions chimiques différentes ; certaines ont pu être définies et identifiées, mais d'autres restent encore à préciser.

La basophilie, base de l'ancienne analyse chromatique, bien qu'elle ait permis de différencier la structure des êtres vivants et fourni des indications utiles pour préparer la voie à de nouvelles recherches, ne peut à elle seule fournir et définir la constitution chimique.

Diverses substances peuvent présenter cette basophilie, en particulier les substances acides, comme les acides nucléiques, les polysaccharides acides, les pigments chromolipoïdes, l'acide urique et ses dérivés et enfin un certain nombre de protéines acides.

L'affinité des éléments cellulaires pour les colorants basiques se complique encore avec la notion de « méta-chromasie ». Le bleu de toluidine, le bleu polychrome, le bleu de crésyl brillant, l'azur B de méthylène, la thionine, peuvent donner avec certaines substances basophiles des colorations fortement méta-chromatiques.

Le mucus, la substance fondamentale du cartilage, les granulations des mastocytes, des polynucléaires basophiles du sang sont colorés en rouge pourpre ou en rouge violacé.

D'autres substances dites « azurophiles » prennent seulement les colorants basiques du type Azur, en changeant leur coloration primitive en une teinte bleue, rouge foncé. Elles peuvent présenter une nature chimique différente. Ainsi les colorations histologiques données par la basophilie, la métachromasie, l'azurophilie, peuvent fournir d'utiles indications sur l'évolution chimique d'une substance cellulaire au cours de la maturation, ou de la différenciation des cellules. Elles peuvent orienter l'étude dans des directions précises, mais ne permettent pas de définir la composition chimique des substances basophiles, métachromatiques ou azurophiles, la complexité du problème est encore plus grande du fait que certaines substances cellulaires sont simplement basophiles ou basophiles et métachromatiques et que, dans certaines cellules, les granulations basophiles peuvent également se transformer soit en granulations azurophiles ou métachromatiques, soit en les deux successivement.

Les granulations basophiles des Mastzellen d'Ehrlich et des polynucléaires à granulations basophiles du sang sont intéressantes à étudier du point de vue chimique, car dans leur évolution ontogénique elles passent par les différents stades de coloration, azurophile, basophile et métachromatique et aboutissent à la synthèse de divers composés métachromatiques, observables sur des préparations histologiques aussi bien qu'en solution « in vitro ». Ces substances métachromatiques élaborées par les basophiles se sont montrées hautement intéressantes par leurs propriétés thérapeutiques et biologiques. Pour certains auteurs, elles seraient formées d'héparine, grosse molécule active par ses composés soufrés et aussi par son caractère acide, lui conférant des propriétés particulières.

Ce que l'on sait, c'est que l'héparine est métachromatique et acide ; elle est retirée d'organes riches en

éléments mastocytaires qui sont également métachromatiques. On a trouvé en outre que la teneur en héparine d'un tissu est aussi proportionnelle à la teneur en mastocytes. Dans certaines tumeurs riches en mastocytes on trouve une grande quantité d'héparine.

Pour d'autres auteurs, cette élaboration de l'héparine à leur niveau n'est pas encore prouvée.

Il m'a paru intéressant de m'attacher à ce problème. Afin de bien comprendre les basophiles tissulaires et sanguins, et de poursuivre l'étude histochemique des granulations au niveau de ces deux types de cellules hautement différenciées, j'ai entrepris de rechercher l'origine de ces éléments, de suivre leur développement, leur différenciation, leur maturation et, enfin, leur répartition dans l'organisme pour essayer d'en dégager le rôle.

Je rappellerai brièvement les acquisitions biologiques et biochimiques récentes concernant les différentes substances qu'on leur a attribuées et parallèlement les études histologique, physiologique, histochemique et expérimentales faites par les différents auteurs et par moi-même.

Je mentionnerai les résultats récents de l'application thérapeutique de ces substances au cours d'états pathologiques et enfin leur rapport avec les différents produits comme : l'histamine, les hyaluronidases, les collagénases et la substance collagène du tissu conjonctif ou mésenchymateux qui tout récemment ont été démontrés en rapport, direct ou indirect, avec les produits des granulations des basophiles.

1° Les basophiles tissulaires.

Mastzellen, mastocytes ou labrocytes sont des cellules conjonctives décrites par EHRLICH (1877) avec un cytoplasme bourré de granulations qui se colorent de façon métachromatique avec les colorants basiques. La nature héparinique de ces granules est considérée comme démon-

trée par certains auteurs (HOLMGREN et OLIVER entre autres) ; pour d'autres, comme COMPTON, elle est encore à démontrer.

L'origine sanguine de ces éléments a été supposée par un certain nombre d'auteurs comme WEIDENREICH (1908), DANTSCHAKOFF (1910), SABRAZÈS et LAFON (1908), DOWNEY (1911), MICHELS (1922), CHEVREMONT (1950). Pour les uns, ils se formeraient à partir de lymphocytes, des grands mononucléaires ou des plasmocytes, pour d'autres ce seraient des leucocytes migrants en dégénérescence mucoïde : WEIDENREICH (1908-1910), PAPPENHEIM (1904-1908). Les leucocytes du sang peuvent, d'après EBERHARDT et SOLUM, émigrer du sang chez les Oiseaux et se transformer dans les tissus en labrocytes.

L'origine mixte, parenchymateuse, existerait pour MICHELS (1923). Ils se trouveraient dans le mésentère et les organes comme la vessie et le rein chez le Poisson, alors que chez les Reptiles ils se différencieraient à partir des lymphocytes dans la rate, et chez les Amphibiens ce serait à partir de polyblastes.

Pour d'autres, comme JOLLY (1923) les Mastzellen lymphoïdes ne sont pas d'origine sanguine et leucocytaire, ces cellules seraient distinctes des leucocytes lymphoïdes et ne proviendraient pas de la dégénérescence des cellules médullaires. Ils proviendraient pour cet auteur de la différenciation des cellules conjonctives banales. Chez la Souris et le Rat, en examinant l'organisation du tissu conjonctif au moment de la formation de fibrilles durant la deuxième partie de la vie embryonnaire, cet auteur aurait pu suivre cette différenciation à partir des cellules conjonctives ; en étudiant les fœtus de Rat, de Chat, de Lapin et d'Homme, HOLMGREN a pu retrouver cette même différenciation, mais certains auteurs comme ROSENHEIM (1886). COMPTON (1952), ne retrouvent la présence de labrocytes que plus tardivement et contestent cette différenciation qu'ils n'ont pas trouvée. Un résultat négatif ne nous semble pas un argument suffisant et doit servir seulement à nous mettre en garde. D'une manière générale, les auteurs

classiques actuels admettent que les basophiles des tissus (Mastzellen, mastocytes, labrocytes, cellules-engrais, cellules granuleuses, basophiles du tissu conjonctif ou encore histiocytes à granulations métachromatiques des tissus) doivent être différenciés nettement des granulocytes basophiles du sang circulant auxquels ils ressemblent beaucoup.

Leur nature histiocytaire et tissulaire est accentuée pour ces auteurs par leur activité fermentaire et leur fonction de fixer diverses substances, vitamines ou autres ; cette forme correspondrait à un état fonctionnel des basophiles qui peuvent le partager avec des éléments d'origine diverse (fibrocytes, cellules musculaires, etc...).

La différence de solubilité de leurs granulations et leurs propriétés de sécrétion enzymatique seraient en faveur de l'origine mésenchymateuse. Certains auteurs même pensent qu'ils ne dériveraient pas d'histiocytes à fonction anormale ou de fibroblastes modifiés, parce qu'en culture de tissus ils peuvent se diviser par amitose, ce qui plaiderait en faveur d'une souche autonome.

Sans prendre parti dans cette question très complexe et diffuse, je me bornerai à admettre pour le moment qu'ils dérivent du mésenchyme qui provient du mésoderme de l'ovule fécondé.

D'après l'avis de BESSIS, les basophiles tissulaires ou mastocytes sont très répandus dans l'organisme. Ils existent partout où il y a du tissu conjonctif, particulièrement dans les travées conjonctives et la capsule du foie, dans les réseaux du derme et les tissus hématopoïétiques, autour des petits vaisseaux, également dans la moelle, les ganglions lymphatiques et la rate.

Chez l'embryon, ils dériveraient des cellules réticulaires indifférenciées, c'est-à-dire des cellules souches qui donnent naissance aux cellules libres des tissus et du sang circulant.

D'une façon générale, ces cellules appartiennent au système réticulo-histiocytaire et font donc partie du tissu hémohistioblastique indifférencié, spécialisé dans la forma-

tion des cellules réticulaires libres à destinée générale d'une part et des cellules souches directes des organes hématopoïétiques d'autre part.

Les cellules réticulaires libres des tissus, que rien ne distingue des cellules des organes hématopoïétiques, sont des cellules de type histioblastique, elles constituent par leur ensemble le tissu réticuloadénoïdien des ganglions lymphatiques, des follicules lymphatiques de la rate, de la moelle osseuse, du réseau dermique, de la sous-muqueuse intestinale.

Au cours des hyperplasies des cellules de cette lignée, ces éléments indifférenciés vont bientôt subir la différenciation et présenter par la suite des granulations métachromatiques ; nous aurons ainsi un mastoblaste ou cellule différenciée pour l'élaboration ultérieure de substance basophile de type métachromatique. Parfois, au cours d'états pathologiques, au lieu de se différencier, ces éléments jeunes, peuvent se transformer en cellule sanguine par hématopoïèse anormale des tissus réticulo-histiocytaires hépatiques et de diverses glandes endocrines.

Le plus souvent, dans la lignée mastocytaire, au cours du développement ou à la naissance, les mastoblastes déjà légèrement différenciés vont donner une maturation plus accentuée dans le sens mastocytaire en se transformant en promastocytes par division, avec un noyau dont le grand diamètre est perpendiculaire à celui du cytoplasme et dont la chromatine est peignée. Leur cytoplasme présente un mélange de granulations azurophiles, peu différenciées, de granulations transitoires, et de granulations mûres, métachromatiques. D'après les recherches récentes, la nature des granulations basophiles serait tout au début partiellement de composition ribonucléoprotéïmique et ils contiendraient par la suite des composés muco-polysaccharidiques à propriété métachromatique.

La maturation nucléaire et cytoplasmique de ces éléments aboutit par la suite à la formation des mastocytes. Leur noyau sphérique est dense, de teinte uniforme, il peut présenter de grosses mottes de chromatine excentri-

ques ou centrales, parfois il est pycnotique, parfois vacuolaire. Le cytoplasme chromophile peut renfermer soit de nombreuses et volumineuses granulations, métachromatiques dans les formes les plus évoluées, soit des vacuoles contenant encore de petites granulations ou bien vides par suite de solubilisation ou d'excrétion hors de la cellule.

2° Les basophiles sanguins.

La présence dans le sang des leucocytes basophiles ou polynucléaires basophiles décrits par EHRLICH (1878) est exceptionnelle, sinon rare. Chez l'adulte ces leucocytes sont formés dans la moelle osseuse, à partir des cellules souches de la série granulocytaire. Le caractère basophile est déterminé par l'apparition de granulations dans la cellule souche, d'abord indifférenciées et azurophiles, virant ensuite à la métachromasie et à la basophilie.

Ces granulations sont très nombreuses, très grosses, et masquent souvent le noyau pycnotique, d'aspect lavé ; tri- ou quadrilobé. Souvent ces granulations sont contenues dans des vacuoles en nombre variable et certains auteurs pensent que ces granulations sont solubilisées au cours de la coloration. Elles paraissent correspondre à une excrétion des granulations métachromatiques de nature polysaccharidique, en particulier héparinique, avec stades intermédiaires nombreux.

Quelques auteurs admettent une parenté étroite entre les mastocytes et les leucocytes, les appelant respectivement Mastzellen tissulaire et Mastzellen sanguin.

D'après L. ARVY, certains auteurs comme WEIDENREICH, DANTCHAKOFF, PARDI, PAPENHEIM, admettent même que chez les poïkilothermes les cellules à granulations basophiles sont ubiquistes et peuvent fonctionner également dans le sang et les tissus conjonctifs. MAXIMOW s'est opposé à cette conception. Selon lui, il existe chez les Vertébrés inférieurs deux types d'éléments basophiles, ceux des tissus et ceux du sang, éléments ontogéniquement et mor-

phologiquement différents. Il n'y aurait de commun dans les deux types que la présence des granulations basophiles métachromatiques qui sont, pour lui, différentes par la forme et l'intensité de la métachromasie.

Ayant remarqué chez le Lapin, la Souris, le Chat un balancement entre le nombre des basophiles tissulaires et les basophiles sanguins, MAXIMOW et MICHELS pensent qu'il existe une corrélation de compensation entre ces éléments, de même que chez diverses espèces inférieures (Ambliostomes, Clémys, Leuciscus et Cyprinus), mais que chez les Chrysémis, les Phrynosomes et les Gongylus, il y aurait une égalité ou une élévation dans les deux sens.

Chez l'homme également on connaît des cas où il n'y a pas de corrélation entre ces deux sortes d'éléments : dans les cas de leucémie à basophiles, il n'y a pas de variations notables des basophiles tissulaires, et dans les atteintes par mastocytome il y a une élévation de basophiles tissulaires sans modification des basophiles du sang.

Il n'y aurait donc qu'une parenté fonctionnelle, pour l'élaboration des granulations métachromatiques basophiles de type héparinique que nous étudierons plus loin.

Les cellules originelles de la lignée basophile du sang se forment au cours de l'hématopoïèse. Chez l'embryon leur formation se fait surtout aux dépens des îlots mésenchymateux des parois de la vésicule ombilicale.

A la période pré-hépatique, hépatique et lympho-médullaire, on les retrouve toujours indifférenciés dans les territoires correspondants. A partir des cellules-souches réticulaires du système réticulo-histiocytaire, les cellules à direction hémohistioblastique vont se détacher du syncytium embryonnaire en vue de se diviser et se transformer pendant la période proliférative.

Selon le lieu où elles se trouvent, ces cellules conduiront au basophiloblaste, soit après passage par l'élément myéloblastique de potentiel basophile, soit après un passage par l'hémocytoblaste myéloïde qui se transforme rapidement en myéloblaste à potentiel basophile, ou bien encore en passant par des éléments intermédiaires comme

le leucoblaste, cellule primitive de la lignée blanche, plus particulièrement des cellules souches myéloblastiques de type basophiloblaste.

De par cette évolution vers la basophilie, cet élément sanguin est déjà différent de ceux des autres lignées, la cellule a une taille déjà plus réduite, 12 à 15 μ . Son noyau rond ou encoché présente un réseau de chromatine à maille fine et de structure très floue. La chromatine sans grumeaux se dispose en écheveaux ; dans ce noyau il y a souvent 2 à 6 nucléoles à bourrelet chromatique périphérique absent ou esquissé. Son cytoplasme basophile a une bordure protoplasmique étroite ; il ne possède pas encore de granulations.

Quelles que soient les théories émises au sujet des stades intermédiaires entre les cellules hémohistioblastiques et les cellules souches basophiloblastiques, on est actuellement d'accord sur l'origine et l'aboutissement de cette évolution vers la cellule souche de la lignée des basophiles du sang.

La différenciation des basophiles à partir de cette cellule souche chez l'embryon doit se faire sans doute à partir du stade hépatique, avec l'apparition des organes hématopoïétiques comme la rate, la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques ; il semblerait que ce soit dans ces derniers territoires que les cellules souches basophiloblastiques se mettraient à proliférer et à se préparer à la différenciation spécifique. En effet, c'est à partir des stades suivants, au cours des proliférations cellulaires, que les cellules à orientation basophile seront granulées, les granules étant d'abord azurophiles indifférenciés, puis basophiles et métachromatiques. Cette différenciation aboutira successivement au promyélocyte et au myélocyte à granulations basophiles.

C'est surtout chez l'adulte, au niveau de la moelle osseuse, que l'on retrouvera le mieux les différents stades précités.

Le basophiloblaste est souvent impossible à différencier des éléments des autres lignées granulocytaires, ce n'est qu'avec l'apparition de quelques granulations métachromatiques que cette différenciation s'affirme.

La cellule promyélocytique basophile possède quelques granulations grossières, le protoplasme encore bleu renferme des granulations de plus en plus abondantes au fur et à mesure que la cellule devenue différenciée mûrit, et les nucléoles ne seraient plus visibles.

Dans le myélocyte basophile de 12 à 18 μ le noyau est encore rond, le cytoplasme commence à devenir rosé. Les granulations métachromatiques sont plus nombreuses.

Au stade non prolifératif de la moelle, les métamyélocytes basophiles de 12 à 16 μ ont un noyau encoché, mais pas encore segmenté, la chromatine est plus dense avec des amas plus foncés et bien délimités, les granulations métachromatiques sont plus nombreuses dans le cytoplasme chromophobe ou légèrement acidophile. Ils peuvent quelquefois passer dans le sang à ce stade. Enfin, la maturation se continue dans le sang.

Le basophile sanguin, ayant 12 à 14 μ de diamètre, représente le stade terminal de la lignée. Son noyau segmenté, difficilement visible, est dense, formé de trois ou quatre lobes, parfois il est pycnotique. Le cytoplasme, après coloration par le May-Grunwald-Giemsa, est rosé. il renferme beaucoup de grosses granulations métachromatiques solubles dans l'eau. Il semblerait, en outre, qu'il y ait aussi une fonction d'excrétion des granules qui se dispersent dans le milieu ambiant. souvent la cellule devenue plus fragile, se rompt et se détruit en libérant ses granulations métachromatiques.

Dans les cas classiques, ces deux lignées cellulaires, sanguine et tissulaire, demeurent dans leur milieu ; mais on a pu voir, dans certains cas, que les basophiles tissulaires ou mastocytes peuvent apparaître dans la moelle osseuse au cours de diverses myélopathies, leucémies, agranulocytoses, et diverses affections pathologiques, ou même dans quelques cas normaux.

Dans d'autres cas également pathologiques, on peut retrouver des basophiles sanguins dans le tissu conjonctif ; pour les uns, ce seraient des basophiles sanguins migrants ; pour d'autres, ils proviendraient de lignées basophiles dérivant de cellules réticulaires parenchymateuses des organes, du mésentère, de la vessie, et du rein chez le Poisson, des cellules réticulo-lymphocytaires de la rate chez les Reptiles, ou des éléments indifférenciés chez l'Homme pouvant au cours d'états pathologiques se mettre à proliférer et donner une hématopoïèse anormale dans les tissus réticulo-histiocytaires des organes comme le foie et le tissu intersticiel des glandes à sécrétion interne.

Ces éléments basophiles tissulaires et sanguins à granulations métachromatiques sont capables de subir des variations numériques sous l'effet de divers agents, chez le sujet normal au cours du jeûne, de l'hibernation, et dans des cas pathologiques, sous l'action de facteurs agressifs : chocs peptoniques, traumatismes répétés, irritations mécaniques, de facteurs irritants toxiques, métalliques, médicamenteux, hormonaux ; de carences vitaminiques, d'excès de produits enzymatiques, etc...

Leur nombre varie également dans les états inflammatoires, les atteintes du mésenchyme (mésenchymome ou mésenchymatose) avec destruction, atrophie, inflammation, infiltration, métamorphisme, hyperplasie, ou encore dans les états prémalins ou malins de ces tissus, comme les états leucémiques ou cancéreux.

Le rôle des éléments de ces deux lignées a été avancé, en rapport avec la nature héparinique de ses composés dans le maintien de la fluidité du sang, de la régularisation de la perméabilité tissulaire ou capillaire, grâce à leurs dérivés pré-hépariniques comme l'acide hyaluronique.

Ils seraient en outre des éléments de défense grâce à l'héparine. Cette dernière a la propriété de fixer l'histamine (1 mg. d'héparine peut capter 1 μ g. de chlorhydrate d'histamine) et de fixer aussi les protéines libérées lors

des atteintes du tissu conjonctif, de jouer un rôle dans la protection de ces protéines en cas de clivage par des éléments agresseurs, en formant des complexes héparine-protéine moins dissociables. Grâce à leurs dérivés mucopolysaccharidiques, de type mucine, qui, comme les mucines gastriques protègent certains tissus de la dégradation et, enfin, grâce à leurs composés plus dégradés des produits pré et sous-héparinique comme : les dérivés acétylés, les glucosamines, les acides glycuroniques et sulfuriques mis en évidence par nos méthodes histochimiques, les basophiles peuvent aider l'organisme à détoxiquer les tissus par formation de dérivés atoxiques qui seront éliminés plus facilement, comme nous l'avons déjà signalé avec J. TURCHINI.

Les basophiles tissulaires et sanguins ont été étudiés du point de vue biologique, physiologique, biochimique et histochimique. Les études tout à fait récentes font ressortir l'intérêt d'un certain nombre de substances qu'ils ont acquis lors de leur différenciation vers la basophilie. En effet, beaucoup d'auteurs, après étude approfondie, ont signalé à leur niveau la présence de produits hépariniques qu'ils considèrent comme prouvée ; pour d'autres, comme COMPTON, leur présence reste à démontrer.

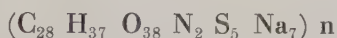
Avant d'aborder les recherches qui font l'objet de ce travail, nous rappellerons brièvement les acquisitions biochimiques récentes sur la nature des dérivés que l'on trouve au niveau des basophiles tissulaires et sanguins.

3° Les produits en rapport avec le métabolisme des mastocytes et basophiles.

On sait que les granulations basophiles ou métachromatiques sont des substances mucopolysaccharidiques diverses, dont certaines seraient de nature héparinique, mucoïtine-sulfurique, hyaluronique, ou bien de nature moins complexe comme les glucosamines plus ou moins acétylées,

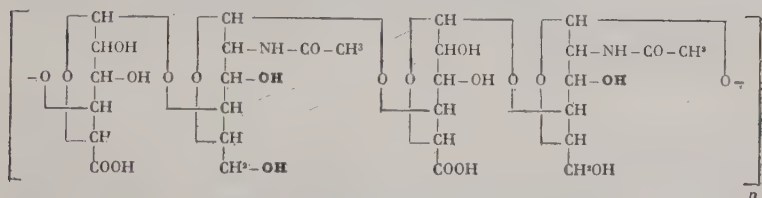
les dérivés glycuroniques et les glycoprotéines. Au plus haut degré de synthèse nous avons les dérivés sulfuriques de l'héparine condensée.

L'héparine est un mucopolysaccharide acide, hautement polymérisé, dont l'unité de structure est formée par un ester polysulfurique de mucoïtine comportant une molécule d'acide glycuronique, une molécule de glucosamine, une molécule d'acide acétique liée à la fonction aminée de la glucosamine et plusieurs molécules d'acide sulfurique, estérifiant à la fois les hydroxyles de l'acide hexuronique et ceux de la glucosamine. Pour JORPES, la formule brute serait :



L'héparine possède dans sa formule développée des groupements sulfuriques qui se fixent sur des groupements hydroxyles de l'acide glycuronique et de la glucosamine.

Formule développée de l'Héparine :



Selon le nombre de radicaux sulfuriques, on aura des esters polysulfuriques plus ou moins élevés, et les héparines obtenues chimiquement sont des mélanges mono-sulfuriques, di et trisulfuriques ; de par sa formule théorique, elle pourrait être tétrasulfurique, le groupement aminé de la glucosamine peut être remplacé par l'acide sulfurique, tout comme il l'est par l'acide acétique.

Tout porte à croire que l'activité anticoagulante de l'héparine est liée à la teneur en radicaux sulfuriques, l'activité biologique augmente en flèche de 25 à 125 si l'on passe de l'héparine mono à l'héparine trisulfurique. D'ailleurs, certains héparinoïdes de synthèse

sont des esters sulfuriques de substances hydrocarbonées azotées.

L'héparine a une charge électrique très importante due à sa teneur en esters sulfuriques et à un degré d'ionisation élevé. Elle se dissocie complètement en solution et possède une conductibilité électrique spécifique de l'ordre de 85×10^{-4} . La mobilité électrophorétique est de l'ordre de 17×10^{-5} ; la pression osmotique est faible.

L'héparine se comporte chimiquement comme un acide fort avec les sels minéraux, elle donne des sels solubles (Na et Ca) et insolubles (Ba et Pb). Avec les protéines, l'héparine donne des sels stables, cette combinaison héparine-protéine modifie leur solubilité, leur point isoélectrique, leur constante électrophorétique.

L'héparine peut, si ces protéines sont douées d'une activité biologique, soit les activer, soit les neutraliser. C'est ainsi qu'elle peut se combiner avec la caséine, la gélatine, les albumines, les protamines. Le complexe gélatine-héparine serait plus dissociable que le complexe protamine-héparine. A l'inverse des protéines citées, les protamines peuvent neutraliser son pouvoir anticoagulant.

Le pouvoir anticoagulant de l'héparine qui la caractérise essentiellement est basé sur la propriété de neutraliser certaines protéines intervenant dans la coagulation sanguine, en formant un complexe héparine-albumine X. Ce complexe acquiert à son tour un pouvoir antithrombotique. L'héparine possède aussi une action antithromboplastique par neutralisation directe de l'antithromboplastine, et elle agit alors de façon indirecte sur l'antithrombine, ce qui est prouvé par l'allongement du temps de Quick.

La salmine, qui est une protamine, est capable, à l'inverse de l'albumine X, d'inhiber l'antithrombine de l'héparine en dissociant le complexe héparine-albumine X. La protamine ayant plus d'affinité forme alors avec l'héparine un complexe plus stable, tandis que l'albumine X donne avec elle un complexe plus labile et dont la constante de dissociation est plus forte.

A côté de son pouvoir anticoagulant l'héparine peut, par son action sur les protéines riches en groupements aminés et de nature basiques, agir sur d'autres substances. C'est ainsi qu'elle peut inhiber « in vitro » et « in vivo » les enzymes protéolytiques comme la trypsine et certaines tryptases, en se combinant avec elles, ou bien en fixant les protéines visées pour les rendre moins dissociables et les protéger contre leurs actions. L'héparine inhiberait également les hyaluronidases : facteurs dépolymérisants de l'acide hyaluronique et mucoïtine-sulfurique du tissu conjonctif et du collagène qui permettent la diffusion des éléments agressifs d'origine chimique, biologique et même cellulaire. De par cette propriété l'héparine protégerait les tissus et parois capillaires en évitant l'attaque du ciment intercellulaire de leurs cellules et des formations conjonctives. Elle favoriserait la production d'acide hyaluronique, de l'acide mucoïtine-sulfurique, qui eux-mêmes font partie de sa molécule.

L'héparine, par ses substances soufrées et ses constituants, peut, dans une certaine mesure, influencer les collagénases actives sur le collagène et la substance fondamentale de nature mucopolysaccharidique et protéinique. L'héparine neutraliserait partiellement leur effet et permettrait alors à ces substances collagènes et fondamentales de mieux résister à l'action diastasique.

L'héparine, en plus, est capable de neutraliser dans le sérum le complément du sang de nature protéinique. Comme ce dernier sert dans le processus de défense, l'héparine peut interférer avec les phénomènes de l'immunité et gêner dans une certaine mesure la défense de l'organisme.

L'héparine peut neutraliser également l'histamine « in vitro » et « in vivo » en protégeant l'organisme du choc anaphylactique.

De par ses groupements sulfuriques et sa glucosamine elle peut fixer les colorants basiques : bleu de toluidine,

Azur A, thionine, pour donner un précipité de coloration métachromatique qui sert soit pour son dosage, soit pour sa séparation par précipitation.

Plus récemment nous avons pu montrer avec J. TURCHINI que l'héparine, en se dégradant, peut donner l'acide mucoïtine sulfurique, l'acide hyaluronique, des groupements sulfuriques, de l'acide glycuronique, de l'acide acétique. Ces substances ainsi libérées pouvaient agir pour leur propre compte dans la défense de l'organisme, surtout lors de la détoxication des substances nocives par sulfo-conjugaison, glycuro-conjugaison et acétylation.

Voisin de l'héparine et moins condensé, l'acide mucoïtine-sulfurique est une substance polysaccharidique de type mucine tout comme les mucines gastriques. Il peut inhiber les hyaluronidases par un antagonisme plus ou moins spécifique dont le mécanisme d'action est peu connu. Cependant cet effet d'inhibition a été observé comme un fait expérimental au cours des essais thérapeutiques.

L'acide hyaluronique, hautement polymérisé et combiné à des protéines, est un constituant de base des mucoprotéines et des substances collagènes. Il peut par sa nature chimique attirer à lui les mucases et polysaccharidases, enzymes mucolytiques et dépolymérisantes. Il tend par sa forte viscosité à limiter la diffusion des métabolites. Il peut aussi servir soit à remplacer et à fournir la substance nécessaire à la formation du ciment intercellulaire de la paroi des vaisseaux, soit à renforcer la trame protéique et à lutter dans une certaine mesure par son abondance contre l'effet des hyaluronidases.

On voit donc, par ces notions brièvement rassemblées, que l'héparine, chef de file de toute une série de substances, est en rapport avec beaucoup de facteurs biologiques de l'organisme, en particulier des tissus et du sang. Il est probable que sa synthèse débute à partir des groupements hydrocarbonés azotés comme les glucosamines. sur

lesquels se greffent l'acide acétique, l'acide glycuronique, l'acide sulfurique. Cette synthèse à partir des hydrates de carbone et de l'azote conduira successivement, par des étapes intermédiaires, à l'héparine mono-sulfurique et tri-sulfurique. Il est également probable qu'au cours de la synthèse héparinique, il y ait une participation d'une série de facteurs enzymatiques qui font intervenir l'acétylation, la glycuco-conjugaison, la sulfonation, ainsi que des enzymes polymérisantes ou dépolymérisantes de ces substances.

Selon les besoins de l'organisme, les cellules élaboratrices peuvent, ou bien synthétiser, ou bien dégrader l'héparine ou ses dérivés avec le concours de tous ces facteurs, au cours de réactions de synthèse réversible.

Les mastocytes tissulaires et les basophiles du sang qui élaborent les granulations métachromatiques ont été considérés comme le lieu de formation de l'héparine et ses dérivés parce que les granulations sont colorables au bleu de toluidine, qu'elles disparaissent chaque fois que l'héparine passe dans le sang circulant. La nature héparinique de ces granulations est considérée comme démontrée par un grand nombre d'auteurs, se basant : 1^o sur les variations quantitatives et morphologiques des Mastzellen étudiés dans diverses conditions expérimentales ; 2^o sur les observations des cas pathologiques où le nombre des mastocytes est élevé, accompagné d'une augmentation de l'héparinémie et enfin 3^o sur l'étude histochimique des basophiles du sang normal et dans les cas de leucémie à basophiles où la synthèse s'arrête à l'acide hyaluronique ; mais pour d'autres auteurs, comme ROSENHEIM, COMPTON, le fait serait encore à démontrer. En effet, la grande difficulté d'apporter une preuve indubitable était l'absence de réactions chimiques précises de l'héparine en dehors de la métachromasie. D'autre part, certains auteurs, pharmacologistes et physiologistes, avaient augmenté la difficulté en décelant au niveau des mastocytes des quantités élevées d'histamine sur des préparations d'iléon de Cobaye.

isolé, ce qui a jeté un doute sur le rôle des mastocytes dans l'élaboration de l'héparine. Cette difficulté n'est en réalité qu'apparente ; nous l'expliquerons au cours de ce travail.

Pour notre part, ayant étudié ces éléments avec notre maître, le Professeur TURCHINI, depuis 1952, nous avons essayé de mettre au point des méthodes d'investigation histochimiques de l'héparine et ses dérivés basées sur la conservation histologique de ces substances du type héparinique et à la détection *in situ* de façon rigoureuse par des réactions chimiques variées : réactions de groupe et de constituants utilisées en méthode convergente. Nous espérons apporter, par le présent travail, une contribution à l'étude qualitative et quantitative des granulations basophiles. Nous avons essayé d'établir leur relation avec la synthèse de l'héparine et de ses dérivés, enfin nous avons recherché la parenté et le rôle physiologique de ces éléments basophiles dans les conditions soit proches de la normale, soit expérimentales et pathologiques où ils sont augmentés.

II

MÉTHODES HISTOCHIMIQUES
de détection qualitative
des produits hépariniques, de leurs dérivés
et
Méthodes d'appréciation quantitative
de ces différentes substances
au niveau
des cellules basophiles tissulaires et sanguines

1^o Historique des méthodes de détection histo- chimique de l'héparine.

L'étude des basophiles tissulaires et sanguins a été faite depuis une assez longue période par de nombreux histologistes de renom : WALDEYER (1877), EHRLICH (1877) et ensuite par de nombreuses écoles. Les auteurs ont, selon leur époque, utilisé successivement différentes méthodes et techniques pour les mettre en évidence, étudié leur cytogénie, leur physiologie et enfin pour chercher la nature chimique des granulations observées au sein de leur protoplasme.

Ils se sont appuyés tout d'abord sur l'observation à l'état frais de ces éléments prélevés dans le liquide péritonéal, dans le liquide pleural, dans le sang ; puis, s'aidant de colorants vitaux, ils ont essayé de colorer ces granulations qui prenaient des teintes variables selon les colorants utilisés.

Déjà, il y a bien longtemps, on s'était aperçu que certains colorants basiques teignaient ces granulations différemment, d'où leur appellation de « granulations basophiles » ou « métachromatiques ».

Depuis, on les a étudiées au microscope à contraste de phase et en présence de colorants ; certains détails de leurs éléments ont été observés au microscope électronique.

Ces auteurs ont utilisé des préparations de mésentère étalé, de gouttes de sang.

L'étude histologique et cytologique de ces éléments a été poursuivie au niveau des tissus, du sang et dans divers organes : chez l'Homme, divers Mammifères et Vertébrés inférieurs. Par la suite, suivirent des expérimentations et des observations sur la variation de leur nombre au niveau de différents tissus, dans les conditions normales et pathologiques et dans diverses conditions expérimentales.

C'est surtout depuis les travaux de JORPES, de HOLMGREN et WILANDER (1937), WILANDER (1939), EHRSTRÖM (1943), SUOMALAINEN, HARMA, LETHO, SILVEN, que l'attention des chercheurs a été attirée sur ces éléments des tissus et du sang. Plus récemment, les auteurs scandinaves ont suggéré que la dénomination « héparinocytes » appliquée aux leucocytes à granulations basophiles par EHRSTRÖM soit réservée aux basophiles tissulaires.

Les premiers auteurs avaient montré que les granulations métachromatiques des basophiles étaient formées de substances de type mucoïde vues par HOYER (1880), HARRIS (1900), STAMMLER (1921) et étaient semblables à l'acide mucoïtine-sulfurique, et ils ont émis l'hypothèse que cette substance, révélée dans leur étude par la métachromasie, était de l'héparine.

Pour renforcer cette hypothèse, différents auteurs ont rapporté des corrélations entre le nombre des mastocytes et la quantité d'héparine d'un tissu donné et ont montré que certaines tumeurs à mastocytes contiennent une grande quantité d'héparine.

ASBOE-HANSEN (1950) constate que le nombre des mastocytes varie parallèlement à la quantité d'acide hyaluronique et que des granules observés présentent les mêmes réactions cytochimiques que cet acide. Il suggère que les mastocytes sécrètent à la fois de l'héparine et de l'acide hyaluronique.

BAEKELAND (1950), ARVY et GABE (1950), GIANNICO (1950) montrent successivement, par l'expérimentation, que la présence d'un caillot introduit dans l'organisme augmente le nombre des mastocytes et le nombre de leurs granulations. Ces éléments sécrèteraient, en se vidant de leurs granulations, une substance qui donne une plage de fibrinolyse. De même l'administration de thiourée (ARVY et GABE) détermine, chez le Rat, une augmentation nette des mastocytes au niveau du tissu conjonctif des organes hémo-poïétiques, de diverses glandes et du tégument, tandis que le coumarol (GIANNICO) entraîne une diminution du nombre des mastocytes, diminution apparente, qui serait peut-être due à l'excrétion de l'héparine par les mastocytes sous l'action de cette substance.

Tous ces travaux récents, s'appuyant sur la métachromasie des granulations ou sur diverses colorations histologiques, n'apportent pas une preuve directe de la présence de l'héparine. Même l'important travail de ASBOE-HANSEN (1950) montrant que les granulations des mastocytes renferment une substance ayant les mêmes réactions que l'acide hyaluronique n'apporte pas une preuve certaine de la présence de l'héparine.

A ces travaux, il faut ajouter ceux d'ASTALDI et de ses collaborateurs. Ces auteurs, en 1953, ont fait la recherche cytochimique de l'héparine et surtout de l'acide hyaluronique sur la moelle osseuse et le sang périphérique d'une leucémie à basocytes. Ils ont apporté une contribution cytochimique à l'étude des granules en utilisant quelques techniques histochimiques nouvelles, ils ont précisé des données sur la solubilité de la substance métachromatique dans l'eau et ils ont particulièrement étudié l'action des

hyaluronidases de la tête de Sangsue et du testicule sur l'acide hyaluronique et l'acide chondroïtine sulfurique. Ils sont arrivés à la conclusion qu'il existe, au niveau de la substance basophile, dans le cas des leucémies à basophiles, de l'acide hyaluronique et que la synthèse de l'héparine était arrêtée à ce stade par défaut de sulfonation.

Les résultats de ces auteurs n'ont fait que confirmer nos résultats antérieurs (1952) sur la solubilité des granules dans l'eau, ce qui nous faisait préconiser certaines techniques de fixation à base de mélange alcoolique ; mais ces recherches n'apportent pas la preuve histochemique formelle au sujet de l'héparine et aucune méthode de détection histochemique n'a été proposée à notre connaissance.

Les seuls résultats histochemiques apportés sur l'héparine et ses dérivés au niveau des granulations basophiles ont été l'objet d'une note, en novembre 1952, avec mon Maître, le Professeur TURCHINI. Dans cette étude, à cette époque, nous rapportions déjà que la localisation de l'héparine par la réaction métachromatique et son dosage par son pouvoir anticoagulant ou par ses propriétés acides de donner des sels métalliques et de précipiter le bleu de toluidine — effectués par les auteurs qui se sont occupés avant nous de la question — étaient justifiés ; mais que la détection chimique de l'héparine par son groupement sulfurique n'est pas spécifique, parce que de nombreuses substances non hépariniques pouvaient donner la même réaction et que certains polysaccharides acides pouvaient simuler l'héparine. Les techniques employées par ces auteurs ne peuvent donc justifier chimiquement la présence de l'héparine d'une manière rigoureuse.

Et nous avons, dès lors, proposé une nouvelle méthode de détection histochemique plus rationnelle, basée sur une meilleure conservation de l'héparine dans les tissus et l'emploi de réactions chimiques de groupe de celle-ci ou de ses divers constituants, toutes employées en méthode convergente.

Depuis cette date (1952) nous avons pu améliorer nos méthodes par une meilleure conservation de l'héparine et des dérivés hépariniques de type mucopolysaccharidique acide, acide mucoïtine-sulfurique, acide hyaluronique pendant la fixation et éviter les pertes au cours de nos techniques. Nous avons pu adjoindre l'action des diastases spécifiques pour le glycogène, l'acide hyaluronique et pour l'acide mucoïtine-sulfurique, et enfin nous avons adopté différents détails techniques et amélioré nos différentes réactions de groupe et de constituants qui nous permettent de détecter l'héparine et de la différencier des produits qui l'accompagnent au niveau des granulations basophiles. Enfin, nous avons pu mettre au point une technique de numération des mastocytes dans des conditions définies afin d'apprécier les proportions respectives des substances élaborées au niveau des granulations basophiles traduites en pourcentage de basophiles ayant réagi au cours de nos réactions qualitatives dans des conditions de technique précises.

2^e Matériel et techniques de conservation et de détection de l'héparine et ses dérivés.

MATÉRIEL

Au cours de notre étude des basophiles, commencée en 1952, nous avons appliqué sur ces éléments nos méthodes de détection de l'héparine et des produits homologues synthétisés au niveau des granulations des basophiles sur du matériel de provenances diverses, limitées d'abord puis plus étendues au fur et à mesure de nos progrès techniques. Nous nous sommes adressé d'abord à des animaux connus pour leur richesse en mastocytes dans certaines conditions et connus pour la morphologie caractéristique de leurs éléments.

Si les colorations histochimiques permettent de bien repérer les mastocytes par leur métachromasie, il n'en est plus de même lorsqu'on utilise des réactions histochimiques colorées nouvelles qui sont positives, soit pour une réaction de groupe, soit pour une réaction de constituants. Dans ce dernier cas, si les granulations des mastocytes répondent à ces réactions, l'aspect des préparations est si différent qu'on a quelques difficultés à interpréter. Cette difficulté est encore plus grande si, en même temps, les éléments cellulaires non basophiles du voisinage possèdent dans leur cytoplasme des granulations pouvant répondre positivement par leurs groupements constitutifs analogues, ce qui peut conduire à des interprétations erronées : nous risquerions de ranger parmi les mastocytes des éléments bien différents, tout au moins au début de nos recherches. C'est pourquoi nous avons étudié d'abord ces éléments chez la Grenouille, *Rana Esculenta* L., au niveau du mésentère étalé et des différents organes comme le foie, les poumons. Après les recherches préliminaires et la mise au point d'un certain nombre de réactions sur les mastocytes de morphologie assez caractéristique chez cet animal et leurs granulations, nous avons étudié la Souris et le Rat albinos.

Après étude de la morphologie de ces éléments, à l'état normal dans le liquide péritonéal, dans le tissu sous-cutané et au niveau des différents organes les plus riches en ces éléments, nous avons choisi les mastocytes du tissu sous-cutané de ces animaux. Nous avons essayé de provoquer une augmentation de leur nombre dans des conditions expérimentales par des injections à haute dose de peptones et de produits anaphylactisants, mais ces substances font plutôt disparaître les granulations basophiles et font apparaître un retard dans la coagulation du sang.

Nous avons utilisé alors des irritations chroniques, de type mécanique, comme des boules d'œdème ou des traumatismes expérimentaux (piqûres répétées, pointes de feu) afin de créer des inflammations minimes, mais de

type chronique. Nous avons essayé également des substances médicamenteuses ou irritantes administrées en injections sous-cutanées à des doses minimales. Ces injections peuvent amener de petites inflammations, de petits états d'allergie ou de sensibilisation cutanée.

Nous avons utilisé des substances comme l'albumine, les sels de baryum, le bleu de toluidine, la phénolphthaleïne. Dans ces conditions expérimentales, il y a une élévation du nombre des Mastzellen, et c'est sur ce matériel, prélevé et fixé selon nos méthodes, que nous avons fait l'étude histochimique.

Chez la Souris, nous avons choisi comme critère morphologique les Mastzellen de forme ovalaire, situés au voisinage des vaisseaux. Nos observations ont été effectuées sur ces éléments avec des témoins colorés par méta-chromasie, prélevés sur la série de coupes sériées.

Chez le Rat, l'étude des Mastzellen a été effectuée au niveau du tissu conjonctif sous-cutané dans les mêmes conditions, mais avec des doses plus élevées ; nous avons pu y retrouver la même élévation que précédemment, mais avec cependant une apparition plus nette des mastocytes à la périphérie des lésions. Les mastocytes se localisent autour des vaisseaux du tissu conjonctif sous-cutané et sous la couche musculaire superficielle. Ce matériel a été également traité selon nos méthodes. Au cours des prélèvements des pièces, nous n'avons pas observé d'hypocoagulabilité du sang.

Une fois familiarisé avec la morphologie et la cytologie des mastocytes de ces animaux, nous avons étudié, plus récemment, les mastocytes du Chien. Pour l'enrichissement en mastocytes de nos préparations, nous avons utilisé l'action des hormones : cortisone à haute dose (150 mgr.) par jour et pendant une longue durée (dix-huit à vingt et un jours). Cette hormone a été signalée comme pouvant augmenter le nombre des mastocytes. Nous avons expérimenté sur trois chiens normaux, de poids moyen (7-8 kgr.), soumis à un régime déterminé et contrôlés

par des mesures physiologiques (échange gazeux, métabolisme basal, dosage de l'excrétion azotée urinaire, dosage de la glycémie, du glucose, des lipides, du glycogène, par biopsie du foie) (avec HÉDON et coll.).

C'est sur ce matériel que nous avons étudié à notre tour les mastocytes tout d'abord dans les organes (foie, pancréas, rein) puis dans les glandes endocrines (surrénales, thyroïde, hypophyse). Notre étude histochimique a porté essentiellement sur le foie, où les mastocytes ont nettement augmenté sous l'effet de l'hormone glucidoprotidique de la corticosurrénale, et enfin nous les avons étudiés dans les différents organes cités.

Nous avons essayé également d'étudier les basophiles sanguins chez l'Homme normal, mais dans ce cas ces cellules sont rares. Nous avons cherché à enrichir le *sang normal* en éléments basophiles en faisant des frottis plus épais, puis des frottis en goutte épaisse ; malgré ces artifices, les basophiles sont restés rares. Nous avons essayé du sang oxalaté et centrifugé, en faisant des frottis en goutte épaisse, mais l'oxalate produit une altération cellulaire importante.

Ne pouvant utiliser le sang normal hépariné pour l'étude des basophiles, car ceux-ci sont supposés générateurs de cette substance, nous nous sommes contenté de les rechercher dans les *sangs para normaux* où leur nombre était assez nettement augmenté (3 à 4 %). Nous avons pu suivre quelques cas de cirrhose hépatique avec ou sans ascite. Nous avons pu, en outre, étudier un cas de leucémie myéloïde d'évolution chronique avec augmentation des basophiles. Nous avons effectué chez ces malades des frottis ordinaires et des frottis en goutte épaisse.

Les cas de cirrhose étudiés étaient souvent à leur début, quand la cirrhose était accompagnée d'ascite, c'était souvent pour la première fois. La formule sanguine de ces malades était presque normale, sauf l'élévation du nombre des basophiles.

Au cours de la leucémie myéloïde d'évolution chronique, avec augmentation des basophiles, la maladie a été prise tout à fait au début. Nous avons étudié le sang périphérique et la moelle sternale au cours de toute la maladie (1953-1954) et ensuite au cours du traitement par le phosphore radioactif. Le sang et la moelle ont été étudiés sur frottis épais, secs ou humides, et en gouttes épaisses. Ces frottis ont été séchés selon les techniques ordinaires ou fixés humides selon nos techniques.

TECHNIQUE

Technique de fixation et d'inclusion en vue de la détection.

Au début de nos études, nous avons signalé que beaucoup d'histologistes proscrivent l'emploi de l'alcool et préconisent des fixateurs aqueux comme le formol, le liquide de Bouin, de Helly ou celui de Zenker pour mettre en évidence les mastocytes. Pour ces auteurs, les fixateurs à base d'alcool ont l'inconvénient de vacuoliser le cytoplasme et de faire gonfler les granules des basophiles. A ce sujet, nous avons pu nous rendre compte que les fixateurs histologiques permettent la coloration des granulations. Ces dernières sont nettement individualisées avec ces fixateurs. La cellule basophile présente un cytoplasme délié avec de petites granulations régulières et très nettes et souvent, des granulations claires ou peu colorées. Ces dernières granulations apparaissent plus nombreuses si, au cours des lavages des colorations, on ne passe pas vite dans les réactifs aqueux. Les granulations, au cours de ces colorations, perdent peu à peu de leur volume par rapport aux granulations des lames témoins ; il y aurait donc une perte de la substance basophile au cours des manipulations histologiques ordinaires. Nous comprenons que les histologistes évitent l'emploi de l'alcool. Ce dernier, en insolubilisant la substance basophile et en évitant sa perte, fait apparaître les granulations plus grosses et la cellule plus empâtée.

Nous comprenons leur préférence pour les fixateurs ordinaires, qui donnent des images plus nettes, plus déliées et plus jolies ; mais ces images ne traduisent pas la présence de l'héparine libre et des substances voisines : acide mucœtine-sulfurique, acide hyaluronique, qui sont solubles dans l'eau. Les techniques classiques pour l'étude morphologique des granulations basophiles, pour ces raisons, ne visent pas à la mise en évidence de l'héparine libre et de ses dérivés de façon complète, tout au contraire.

Nous avons pu montrer déjà en 1952 que l'héparine, l'acide hyaluronique, l'acide mucœtine-sulfurique purs sont solubles « in vitro », que leurs solutions aqueuses ou dans du sérum physiologique, assez concentrées, ne sont pas précipitées lorsqu'on les ajoute dans un rapport de 1.50 dans les fixateurs comme le liquide de Helly, de Zenker ou de Bouin. Le formol à 15 % mérite une place à part : bien qu'il soit aqueux, il peut précipiter partiellement ces substances, mais ce n'est qu'après un temps assez prolongé.

Nous avons essayé encore d'imprégner des morceaux de papier-filtre et des tranches de moelle de sureau avec les substances précédentes, puis nous les avons placés dans les différents fixateurs aqueux. Ces derniers laissent diffuser la substance.

Nous avons alors incorporé à la solution de produits hépariniques de l'albumine d'œuf. Puis le tout est coagulé par la chaleur. Des tranches de substance ainsi confectionnées ont été placées dans les fixateurs aqueux ; après lavage et traitement histologique, nous nous sommes aperçus que les coupes obtenues présentaient une perte énorme de ces produits alors que les fixateurs de type alcoolique comme le liquide de Carnoy, l'alcool méthylique, l'alcool absolu acétifié à 10 %, le liquide de Bouin-Hollande alcoolique au sublimé les précipitent beaucoup mieux sur les papiers filtres, moelle de sureau et blanc d'œuf coagulé traités selon nos techniques. Le liquide de Carnoy, même dilué au 1/4 par la solution aqueuse d'héparine ou

d'acide hyaluronique ou d'acide mucoïtine-sulfurique les précipite encore.

Nous avons appliqué par la suite ces fixateurs sur les tissus et organes riches en mastocytes avec de bons résultats.

Pour les lames de sang, nous avons observé qu'au cours de nos réactions d'hydrolyse ou de traitement acide énergétique, il valait mieux utiliser le liquide de Bouin-Hollande alcoolique sublimé. Ce dernier, supérieur à l'alcool méthylique ou à l'alcool absolu, fait adhérer plus fortement les éléments cellulaires aux lames et évite leur décollement et leur altération.

Du point de vue histochimique, les fixateurs aqueux ne peuvent donc servir pour mettre en évidence la totalité des dérivés hépariniques vu les pertes constatées « in vitro » et sur les coupes histologiques. Les fixateurs de type alcoolique agissent rapidement, il n'y a pas d'intérêt à surfixer les pièces. La durée pour le liquide de Carnoy est de 2 à 6 h. Pour l'alcool méthylique ou éthylique elle est de 6 à 12 h. Pour le liquide de Bouin-Hollande sublimé alcoolique, il ne faut pas dépasser 12 à 14 h. Pour les frottis la durée de la fixation avec le liquide de Carnoy est de 15 à 30 minutes, il en est de même avec les autres fixateurs. Les Mastzellen et les basophiles du sang ainsi fixés et colorés par le bleu de toluidine par exemple apparaissent plus massivement colorés ; le cytoplasme est plus compact. Les granulations sont moins nettement individualisées ; elles sont plus grossières et paraissent être noyées dans une gangue métachromatique diffuse. Les cellules sont plus densément colorées et les granulations sont moins nettes mais plus nombreuses et fortement colorées.

Les éléments, ainsi mis en évidence dans les cas normaux, traduisent une meilleure conservation de l'héparine. Parfois, on note la présence de mastocytes ou de basophiles sanguins colorés et présentant des vacuoles claires, vides de granulations. L'ensemble de toutes ces

images variables reflèterait un état physiologique plus proche du fonctionnement normal de la cellule. Les résultats sur la solubilité et la conservation de l'héparine auxquels nous étions arrivés en 1952 ont été confirmés depuis par ASTALDI et ses collaborateurs (1953).

En étudiant expérimentalement l'action de l'eau et de l'alcool sur des préparations de basophiles, ces auteurs ont montré que les granules métachromatiques ne sont pas solubles dans l'alcool, mais dans l'eau.

Les substances soumises à l'action des fixateurs alcooliques sont précipitées et plus ou moins coagulées. Si on les reporte dans les milieux aqueux, elles se resolubilisent. Certains produits hépariniques, acide mucoïtine-sulfurique ou hyaluronique, s'ils sont partiellement ou solidement combinés à des protéines, peuvent être retenus par l'action coagulante des fixateurs et résister assez bien à l'action de l'eau ; mais si on ne prend pas des précautions particulières, ils peuvent se dissoudre dans l'eau ou certains solvants histologiques au cours des techniques courantes.

Nous avons fait aussi la contre-épreuve en recherchant la solubilité de ces produits « in vitro » vis-à-vis des solvants histologiques. L'héparine, l'acide hyaluronique, et l'acide mucoïtine-sulfurique ont été mis en solution. Nous les avons précipités par de l'alcool ou du liquide de Carnoy. Après essorage et séchage, nous les avons mis en contact avec les solvants organiques parfois après simple essorage ou même en les redissolvant soit dans une petite quantité d'eau, soit dans un liquide miscible avec le solvant pour ne pas produire de troubles qui gêneraient l'examen.

D'autrefois, nous avons utilisé la substance pure à l'état de paillettes déposées à la surface du solvant. Le contrôle de la solubilité se fait en tube à essai sur fond noir. Nous avons également étudié le comportement d'un mélange de solutions d'héparine, d'acide hyaluronique, d'acide mucoïtine-sulfurique.

Nos résultats de non solubilisation sont résumés dans le tableau suivant :

Solvants étudiés	Héparine (précipitée) et Héparine (solution)	Héparine et acide hyaluronique + acide mucoséine-sulfurique	Acide hyaluronique (Paillette)	Acide hyaluronique (Solution)
Alcool méthylique.....	+++	+++	+++	+++
Alcool éthy- lique absolu....	+++	+++	+++	+++
Alcool 80.....	++	++	++	++
Alcool acétique 10 %.	+++	+++	+++	+++
Alcool éther	++	++	+++	++
Ether.....	++	++ ?	++	++ ?
Acétone.....	+++	+++	+++	+++ ?
Xylol.....	++ ?	++ ?	+++ ?	++
Toluène.....	++	++	+++ ?	++
Acétate d'amylo.....	+++	+++	+++	+++

Au cours des techniques histochimiques, d'après ces résultats, nous éviterons donc le xylol et le toluène au cours des inclusions et nous emploierons plutôt l'acétate d'amyle. Si nous sommes obligé de passer dans ces solvants, les pièces ne séjourneront que le temps minimum. L'étalement des coupes se fera à l'alcool à 70°. Le séjour dans les alcools faibles sera réduit au minimum. Les colorations au bleu de toluidine se feront de préférence en milieu alcoolique.

3^o Méthode de détection qualitative de l'héparine, des dérivés hépariniques et polysaccharidiques.

A côté d'une meilleure conservation de l'héparine, et de ses dérivés, au cours de la fixation et des différentes manipulations histochimiques, nous avons essayé de constituer une méthode histochimique de détection valable pour l'héparine et capable de la différencier des dérivés préhépariniques de type polysaccharidique, qu'ils soient acides ou neutres ou même de dérivés plus simples.

L'héparine, à l'heure actuelle, a été mise en vogue, elle est mieux connue grâce aux travaux des chimistes, biologistes, pharmacologistes et thérapeutes. Cette molécule organique complexe, très condensée, de formule globale :



est un ester polysulfurique de l'acide mucoïtine-sulfurique. L'héparine comporte dans sa molécule :

1^o une molécule d'acide hyaluronique (le plus souvent formée d'acide glycuronique),

2^o une molécule de glucosamine plus ou moins acétylée caractéristique des mucoïtines,

3^o plusieurs molécules d'acide sulfurique estérifiant à la fois les hydroxyles de l'acide glycuronique et de la glucosamine.

Les héparines sont constituées par un mélange d'éthers sels mono, di ou trisulfuriques.

La présence des radicaux sulfuriques leur communique un caractère acide très marqué. Avec les groupements aminés de sa molécule, les radicaux acides surtout confèrent à ces substances la plus grande partie du pouvoir anticoagulant.

De par sa nature condensée et complexe, de par ses relations avec les divers polysaccharides soufrés, des polysaccharides acides, des polysaccharides neutres, des mucines, des glucoprotéines, et des polysaccharides non azotés comme le glycogène, l'héparine mérite d'être étudiée histochimiquement de façon approfondie, afin de la différencier de tous ces produits. C'est pourquoi nous avons été amenés à étudier les nombreuses réactions histochimiques.

Malgré la complexité de sa structure et sa ressemblance avec ses différents dérivés, il nous a paru, après une longue étude, qu'il est possible d'en déterminer la nature et de la différencier des autres substances voisines.

LES RÉACTIONS HISTOCHIMIQUES DE L'HÉPARINE

L'héparine se présente comme une grosse molécule complexe, elle ne peut, de ce fait, avoir une réaction histochimique unique spécifique. Pour la détecter avec précision, il faut chercher des réactions histochimiques soit assez spécifiques, soit moins spécifiques, mais plus nombreuses et employées en méthode convergente pour pouvoir la déceler avec certitude.

Grâce aux progrès de l'histochimie et aux recherches biologiques, cette détection a été rendue plus efficace grâce à l'emploi des diastases spécifiques et sélectives, et des techniques cytochimiques ou des réactions particulières nouvelles qui permettent de mettre au point des méthodes de détection valables. Cette dernière pourra être améliorée encore par suite, si on prend soin de n'appliquer ces réactions ou méthodes qu'à des éléments histologiques bien définis, et de vérifier les réactions utilisées avec

des réactifs préalablement contrôlés et sur des substances témoins extraites ou purifiées après étude biologique et biochimique précises. La comparaison des réactions colorées obtenues sur coupes et celles des substances pures nous a donné de très précieux renseignements. Après de nombreuses recherches, nous avons proposé, pour la détection de l'héparine, des réactions de groupe et des réactions de constituants associées à l'action spécifique des diastases. L'application de ces méthodes nous donne un faisceau de résultats plus favorable à la détection d'une de ces substances. Cette détection, sera positive quand toutes ces réactions seront obtenues, ou du moins feront pencher en faveur de l'une de ces substances.

a) *Les réactions de groupe de l'héparine.*

1° Par sa nature mucopolysaccharidique acide, l'héparine entre dans le *groupe des substances polysaccharidiques*.

Ces substances peuvent être mises en évidence si les groupements hydroxyles de sa molécule sont situés de façon convenable, et qu'ils ne soient pas saturés complètement par l'acide sulfurique ou par toute autre substance. C'est ainsi que l'héparine monosulfurique peut être détectée par les réactions de ce groupe (comme la réaction de Mac Manus à l'acide per-iodique et réactif de Schiff) alors que l'héparine trisulfurique peut échapper à la réaction. Cette réaction de groupe n'est pas spécifique de l'héparine ni des mucopolysaccharides acides puisqu'il y a exception. Elle met en outre en évidence des mucoprotéines, des glucoprotéines et des polysaccharides non azotés comme le glycogène, cependant, elle présente un grand intérêt parce qu'elle met en évidence d'une façon générale, les polysaccharides non azotés et azotés sauf dans les cas particuliers dont il faut tenir compte : nous l'appellerons la *réaction P.A.S. O.*

Elle est améliorée par l'action de la salive qui élimine le glycogène et qui permet de séparer cet élément non azoté des autres dérivés mucopolysaccharides acides et

neutres. La réaction de Mac Manus après salive sera pour nous *la réaction P.A.S. I.*

La hyaluronidase testiculaire est une diastase complexe, formée d'un mélange de deux sortes de diastases. Elle agit sur l'acide hyaluronique et sur l'acide mucoïtine-sulfurique ; beaucoup d'auteurs voudraient ne pas lui donner le nom de « hyaluronidase » qui doit être réservé à la hyaluronidase, soit bactérienne, soit de la tête de Sangsue qui agit plus spécifiquement sur l'acide hyaluronique. ASTALDI l'a signalé dans son travail et nous l'avons vérifié « in vitro » sur des substances d'extraction. La hyaluronidase testiculaire est capable de dépolymériser aussi l'acide mucoïtine-sulfurique à une certaine température avec un temps d'action convenable.

La réaction de Mac Manus, après action de la salive et après action de la hyaluronidase bactérienne ou de la tête de Sangsue serait *la réaction P.A.S. II.* Elle élimine le glycogène et l'acide hyaluronique et laisse tous les autres dérivés mis en évidence par la réaction P.A.S. I. Pour nous, cette réaction serait la réaction la plus importante du groupe des polysaccharides cellulaires autres que le glycogène, surtout si les réactions P.A.S. I et P.A.S. II sont associées aux autres réactions de constituants ou même de groupes de substances non polysaccharidiques.

La réaction de Mac Manus, après action de salive et d'un mélange de hyaluronidases testiculaire et bactérienne ou *réaction P.A.S. III* élimine beaucoup de substances et révèle des muco-protides de type muco-polysaccharide neutre et des gluco-protéines non sensibles à ces diastases.

Par le jeu de ces quatre réactions, en fonction du temps, de la température et de l'activité enzymatique, il nous a paru possible de faire la distinction entre les muco-polysaccharides, les muco-protéides et les glucoprotéides, bien entendu avec le concours des autres réactions chimiques de groupes de types différents, comme la détection, soit

du groupe acide, des groupements sulfuriques, ainsi que des réactions de constituants.

2° *Le groupement acide de l'héparine.*

L'héparine, par sa fonction acide, donne des sels avec les métaux lourds insolubles, comme le sel de baryum et le sel de plomb.

Nous avons pu obtenir avec l'*acétate de baryum* une réaction positive. L'acétate de baryum frais provenant de la décomposition du carbonate de baryum, avec un très léger excès d'acide acétique, se combine avec les dérivés hépariniques, et le baryum est mis en évidence par sa laque d'alizarine en milieu faiblement acide. Cette réaction est positive au niveau des granulations, parfois il faut acidifier un peu plus le mélange de baryum pour obtenir une réaction plus nette. Nous pensons que cela est dû à ce que l'héparine est plus ou moins combinée à des protéines par sa fonction acide. Cette facilité de réaction et cette positivité secondaire après acidification peuvent donner, pensons-nous, une idée sur la nature de l'héparine libre et combinée. Au début, nous avons observé les réactions plus ou moins fortes, nous les avons attribuées à ce que l'héparine était plus ou moins condensée en acide sulfurique ; actuellement, il semble y avoir, en plus de cet état, un certain degré de masquage de l'héparine par les protéines cellulaires. Cette réaction au baryum n'est pas spécifique de l'héparine. Elle apparaît aussi au niveau des noyaux cellulaires, des hématies, de certaines cellules épithéliales ou des endothéliums. Elle peut avoir seulement une valeur indicative au niveau des granulations basophiles.

Avec le plomb, l'héparine peut donner des précipités : nous avons essayé l'*acétate de plomb* et le *plombite de soude*. Mais il existe au niveau des tissus et des cellules des substances qui précipitent le plomb, si bien que nous n'avons pas poussé plus loin cette étude. Le plombite de soude donne de meilleurs résultats, mais il exige une

technique plus longue et délicate et on ne peut dans ce cas déterminer ce qui revient aux groupements soufré et sulfurique (ces groupements seront étudiés par les réactions de métachromasie qui, placées dans leur cadre, ont une plus grande valeur au cours de l'étude des constituants).

b) *Réaction des constituants de l'héparine :*

1° *Réaction du groupement sulfurique de l'héparine et des dérivés polysaccharidiques acides.*

Le groupement sulfurique peut faire partie des réactions de groupe, mais aussi des réactions de constituants. Il confère à l'héparine sa fonction acide et s'ajoute aux fonctions acides de l'acide glycuronique.

Mais il peut être pris à part comme élément constituant de l'héparine ou de l'acide mucoïtine-sulfurique. Le groupement sulfurique peut se fixer sur la glucosamine à la place de l'acide acétique et lui faire concurrence, si bien que, finalement, l'activité de l'héparine est liée à sa teneur en groupements sulfuriques et la détection de ses radicaux par la métachromasie est justifiée, quoiqu'avec certaines restrictions, et cela en accord avec LISON.

Pour cette détection, nous utilisons le principe suivant : nous faisons d'abord une réaction de métachromasie globale, avec un colorant basique, et nous utilisons le réactif du type Undritz (bleu de toluidine à l'alcool méthylique) ou éthylique absolu en milieu neutre ou légèrement acide (selon la qualité de l'alcool).

Toutes les substances métachromatiques dans cette réaction globale sont ainsi révélées : mucopolysaccharides, mucoïdes, acide hyaluronique, acide mucoïtine-sulfurique et les dérivés hépariniques à radicaux sulfuriques.

Ensuite, nous avons fait une réaction plus élective avec la réaction de métachromasie acide selon LISON, en dissolvant le bleu de toluidine dans de l'alcool préalablement ajusté à pH 2 au moyen de l'acide chlorhydrique.

Cette réaction, que nous appellerons réaction de *métachromasie acide*, met en évidence moins d'éléments que la réaction de métachromasie globale. Elle colore surtout : l'acide mucoïtine-sulfurique, l'héparine monosulfurique et l'héparine trisulfurique.

Le jeu des deux réactions métachromatiques sur coupes sériées de même épaisseur et d'un même organe possédant une teneur en mastocytes constante et numériquement repérée préalablement, nous a permis de constater une diminution des éléments métachromatiques et de distinguer les éléments à radicaux sulfuriques positifs en milieu acide des autres éléments. Cette réaction, basée sur la réponse des radicaux sulfuriques, vis-à-vis des colorants basiques, est sensible, car directe. Elle va dans le même sens que la réaction avec le baryum et elle est beaucoup plus commode. Cependant, l'association de ces deux groupes de réaction fournira plus de renseignements et plus de sécurité, chacune pouvant donner une signification particulière. Parfois, certains dérivés hyaluroniques peuvent gêner la réaction de métachromasie acide. Pour éviter cet inconvénient, nous avons utilisé la hyaluronidase bactérienne « Hyason » en solution physiologique (le chlorure de sodium, en effet, nous l'avons vérifié « in vitro », ne modifie pas la métachromasie du bleu de toluidine et exalte surtout l'action du ferment). Cette diastase agit sur la solution pure d'acide hyaluronique : la métachromasie disparaît en dix minutes, alors qu'elle subsiste dans les solutions d'héparine Choay ou Fournier que nous avons utilisées comme réactif témoin de la métachromasie.

En ce qui concerne l'acide hyaluronique, les hyaluronidases testiculaires (Choay ou Grémy) (*) ont donné les mêmes résultats dans les mêmes conditions.

(*) Nous remercions les différents laboratoires pour la documentation et l'envoi gracieux des produits utilisés.

2^o Réaction de l'acide glycuronique.

Constituant de la molécule d'héparine, il peut être révélé par la réaction de Tollens à la naphtorésorcine appliquée sur coupe. Elle doit être réalisée en milieu faiblement acide et ramenée en milieu neutre. Les granulations, dans cette réaction modifiée par nous, apparaissent brun grisâtre, conformes aux réactions témoins « in vitro », soit avec de l'acide glycuronique, soit avec des solutions d'héparine légèrement hydrolysées. Cette réaction sur des coupes ordinaires n'est pas spécifique car l'acide glycuronique peut exister dans de nombreuses substances cellulaires. Cependant, si elle est positive au niveau des granulations des mastocytes, elle prend intérêt à ce titre.

3^o Réaction de la glucosamine.

Ses réactions sont encore peu connues. ASTALDI a utilisé la méthode de Mac Manus-Cason selon le principe suivant : les produits de type glucosamine n'ont pas de groupements 1.2. glycol acétylables et restent toujours Mac Manus +, ils résistent à l'action de l'acétylation par un mélange pyridine-anhydride acétique à 45° pendant 10', et à la désacétylation postérieure par KOH. Cette réaction intéressante permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de ces groupements glycol et peut à la rigueur donner des indications utiles, mais nous avons préféré utiliser la réaction des fluorones vis-à-vis de la glucosamine. La fluorone à fonction phénol. en présence de sucre aminé, après légère hydrolyse, donne une coloration lie-de-vin à rouge vineux. Cette réaction de condensation après hydrolyse acide nécessite, selon le matériel et l'animal, un temps d'hydrolyse plus ou moins poussé. Nous pensons que la variation de la durée d'hydrolyse est en rapport avec la structure héparinique plus ou moins condensée, ou d'une combinaison plus ou moins

forte à des protéines. Selon le cas envisagé, l'on peut, avec les autres réactions complémentaires, en tirer une indication sur la nature de l'héparine ou sur son mode de liaison avec les protéines.

Pour les autres réactions histochimiques, nous n'avons pas utilisé la réaction de Gomori (acide chromique, urotropine-argent). Bien qu'intéressante, elle ferait double emploi avec les différentes *réactions P.A.S.* qui, utilisées avec les diastases, sont plus spécifiques.

Nous avons fait appel à la réaction de Hale à l'hydrate de fer colloïdal pour détecter l'acide hyaluronique. La réaction est positive sur les granulations, mais non spécifique et inférieure à la réaction *P.A.S. III* utilisant la hyaluronidase bactérienne. Cependant, elle peut avoir une valeur indicative si la réaction est positive et si l'acide hyaluronique est associé à d'autres substances P.A.S. positives masquant sa disparition.

Dans l'étude histochimique des basophiles tissulaires, nous avons pratiqué aussi des colorations histologiques normales qui mettent en évidence ces granulations. Nous avons utilisé la coloration au bleu de toluidine, selon MARTINOTTI, les colorations au bleu polychrome, les colorations hématologiques classiques, le May-Grunwald-Giemsa et surtout les colorations de Undritz qui les mettent mieux en évidence.

4^o Méthode d'appréciation quantitative des différentes substances hépariniques et de leurs dérivés *détectés par les réactions histochimiques basées sur la numération des cellules ayant réagi à ces diverses réactions.*

Devant les réponses positives données par les granulations métachromatiques des basophiles du sang et des tissus au cours de nos diverses réactions de détection qualitative des substances hépariniques, nous avons pu

nous rendre compte de la possibilité de déceler l'héparine monosulfurique, l'héparine trisulfurique, l'acide mucoïtine-sulfurique, les mucines et les glyco-protéines. Ces mêmes substances se retrouvant au niveau des éléments d'un même tissu, d'un même animal ou d'un même sujet, la régularité des réponses des granulations au cours des investigations à l'aide de notre méthode appliquée dans les diverses conditions normales, pathologiques et expérimentales, nous a permis d'entrevoir au niveau des basophiles un mécanisme de synthèse de l'héparine se faisant par une succession d'étapes biologiques en partant des produits les plus simples vers les plus complexes.

Comme il existe une parenté chimique entre toutes ces substances, les plus grosses molécules contiennent les mêmes constituants que ceux qui les précèdent avec un élément nouveau, il nous a paru normal d'y voir un processus de synthèse biologique contribuant à la formation de l'héparine et des héparines condensées en partant de substances unitaires qui acquerraient d'étape en étape une propriété nouvelle.

Nous avons pu remarquer, en outre, au cours des états pathologiques et expérimentaux, que les basophiles étaient capables d'élaborer l'héparine et de l'excréter soit sous l'influence de choc, de stress, dans le torrent circulatoire, soit dans les conditions normales pour maintenir la viscosité du sang, soit encore dans les agressions expérimentales pour servir à la défense de l'organisme, afin d'éliminer les substances toxiques par dégradation de la substances en ses éléments constituants reconnus antitoxiques. Nous avons pu voir également que ce mécanisme de synthèse pouvait être augmenté, perturbé, dévié ou arrêté sous l'influence d'agents pathologiques, de substances exogènes ou endogènes. Selon le cas, on peut se trouver en présence de granulations possédant une prépondérance de réaction histochimique ou d'une absence de réaction, d'une substance biologique ou d'un de ses constituants servant à l'élaboration de l'héparine. Il nous

a paru utile de pouvoir apprécier cette répartition, de déterminer ces différents degrés de la synthèse de l'héparine par le jeu des réactions qualitatives. Mais, pour que cette détermination soit possible, il fallait remplir plusieurs conditions primordiales et il convenait de bien les préciser.

a) *Conditions de la méthode d'appréciation quantitative des dérivés hépariniques.*

Les basophiles, dans le sang ou dans les tissus, représentent à l'échelle cytologique un faible pourcentage. Il n'existe que de rares éléments dans le sang, ils sont un peu plus nombreux dans la moelle, dans les organes et les tissus. On en trouve plus fréquemment dans certains tissus et organes plutôt que dans d'autres : dans les tissus sous-cutanés, le foie, les poumons et les surrénales, autour des vaisseaux. La répartition n'est pas homogène, même dans un même tissu ou dans un même organe. Les basophiles, d'autre part, dans ces différentes régions, ne sont pas soumis aux mêmes conditions de vie, aux mêmes équilibres, si bien qu'au cours de nos réactions assez nombreuses, faites pour les comparer, calculer et déduire, ou en déterminer le pourcentage, nous ne pouvions le faire sur une seule préparation, mais sur plusieurs. Il est nécessaire alors de se placer dans les conditions prévues pour que ces préparations soient homogènes, de même dimension, de même volume et contiennent assez de basophiles, en nombre sensiblement égaux et tous soumis à un facteur donné pouvant orienter la synthèse de l'héparine dans le sens d'une élaboration et d'une condensation, par exemple de produit héparinique au niveau des granulations, avec une activité orientée à peu près uniforme et non désordonnée.

De plus, parmi les nombreuses réactions histochimiques choisies et basées sur des principes très divers, si nous voulions les utiliser pour déduire le pourcentage des cellules ayant réagi à tels groupes de réactions d'une coupe

par rapport à l'autre, il y aurait intérêt à ce que les réactions se passent de façon la plus identique possible, ou bien tendent vers un même but. Il faut, en outre, que, parmi les réactions ainsi groupées, on ait la certitude qu'elles permettent de détecter et de couvrir la gamme des produits pré-hépariniques et hépariniques.

Nous avons essayé, au cours de nos recherches, de nous mettre dans ces conditions.

b) *Choix des réactions chimiques et histologiques pour la numération des mastocytes.*

Parmi les groupes de réaction, nous avons choisi deux séries principales : les réactions métachromatiques et les réactions du P.A.S. (acide per-iodique - réactif de Schiff).

Dans la première série, les deux réactions : métachromasie globale et métachromasie acide, sont à peu près comparables. Elles utilisent le bleu de toluidine en milieu alcoolique, neutre ou acide. Dans la deuxième série, les réactions du P.A.S. dans l'ensemble sont identiques par la réaction de Mac Manus, mais diffèrent entre elles par la nature des extraits enzymatiques agissant sensiblement dans les mêmes conditions.

Nous avons contrôlé par la suite la parenté et les variations des réactions de métachromasie et des réactions aux P.A.S. (au P.A.S. O et P.A.S. I) sur des préparations homogènes et contenant des mastocytes de façon régulière. Ces réactions donnent sur les coupes sériées et homologues d'un même organe, comme le foie, le même nombre de mastocytes et un pourcentage à peu près identique dans les mêmes conditions de numération. Si bien que dans ces conditions on peut faire des comparaisons valables en passant de la première série à la deuxième série de réactions.

En ce qui concerne la gamme des produits étudiés, on peut schématiquement poser que les différentes réactions détectent les substances que nous résumons dans le tableau I suivant, permettant de dégager cinq équations :

TABLEAU I

- 1° Métachromasie globale = héparine trisulfurique + héparine monosulfurique + acide mucoïtine-sulfurique + acide hyaluronique + mucine + glycoprotéine.
- 2° Métachromasie à pH 2 = héparine trisulfurique + héparine monosulfurique + acide mucoïtine-sulfurique.
- 3° P.A.S. I (salive) = héparine monosulfurique + acide mucoïtine-sulfurique + acide hyaluronique + mucine + glycoprotéine.
- 4° P.A.S. II (hyaluronidase bactérienne) = héparine monosulfurique + acide mucoïtine-sulfurique + mucine + glycoprotéine.
- 5° P.A.S. III (hyaluronidase bactérienne + hyaluronidase testiculaire) = héparine monosulfurique — glycoprotéine + mucine.

A ces cinq équations qui couvrent presque toutes les substances, il faut ajouter une sixième équation pour que la détermination soit complète. Il faut en effet pouvoir déterminer le rapport entre les cellules à héparine monosulfurique et les cellules à mucines et glycoprotéines.

Après de longues observations et études, nous avons pu différencier ces deux groupes de produits par la métachromasie acide. En effet, l'héparine monosulfurique est positive tandis que les mucines et les glycoprotéines ne le sont pas. Pour les différencier, on opère de la façon suivante : après digestion enzymatique complète, on fait la réaction P. A. S. d'une part et, sur la préparation témoin d'autre part, on pratique la réaction de métachromasie acide. La différence des résultats de numération nous donne la quantité de cellules à héparine monosulfurique et de cellules à mucine et à glycoprotéine.

Par le jeu de ces six équations, on peut aisément calculer, en partant des dernières relations, le nombre des éléments basophiles ayant répondu positivement ou négativement aux différentes réactions et remonter ainsi jusqu'à la réaction de métachromasie globale.

Pour que ce calcul soit valable, il faut des conditions de recherche numérique définies et un matériel favorable.

Nous n'avons pu appliquer cette méthode quantitative à tous les matériels, car il faut des préparations riches en éléments basophiles pour obtenir un résultat valable. Après examen, nous l'avons appliquée sur les mastocytes du foie du Chien soumis à la cortisone à forte dose et pendant une assez longue période. Sous l'effet de la cortisone, il y a une augmentation très sensible des mastocytes. C'est dans le foie que nous avons trouvé cette augmentation avec le plus de netteté et de régularité. Les mastocytes sont répartis dans tout le foie, au niveau du parenchyme, dans les travées conjonctives, au niveau des parois vasculaires des espaces portes. Les mastocytes sont répartis dans les différents lobules et surtout au voisinage de la capsule de Glisson.

c) *Numération des mastocytes après réactions de détermination.*

C'est sur ce matériel riche, 45 à 55 éléments contre 10 à 12 éléments pour un espace porte moyen normal, que nous avons étudié les granulations basophiles et leur rapport avec la synthèse héparinique sous l'effet de la cortisone. Celle-ci a été signalée par DEGOS et COTTENOT comme ayant une activité sur les mastocytes en favorisant la fixation de l'héparine et les pousse à la stocker dans les granulations basophiles. Cette action dirigée est une condition favorable pour une synthèse orientée de l'héparine et s'oppose à la synthèse ordinaire s'effectuant dans des conditions désordonnées. C'est sur des coupes sériées de foie de 5 μ d'épaisseur fixé au liquide de Bouin-Hollande alcoolique sublimé et traitées selon nos réactions que nous avons fait des numérations.

Cette numération demande des conditions définies, afin de pouvoir comparer et déduire d'une coupe à l'autre ; nous l'avons faite avec soin. Le plus souvent, nous avons repéré les mêmes régions dans la série des coupes. Pour obtenir un « *nombre moyen* » de mastocytes dans le foie, on fait la moyenne du « *nombre unitaire* » que nous avons établi d'après l'étude histologique du foie, dans les zones où les mastocytes sont abondants. Ce nombre unitaire est la somme des mastocytes relevés dans trois champs microscopiques types, que nous avons choisis pour représenter la répartition héparinique :

1^{er} champ : au niveau d'un espace porte ;

2^{me} champ : au niveau d'un vaisseau qui traverse horizontalement le parenchyme de la coupe ;

3^{me} champ : au niveau des travées conjonctives du lobule hépatique.

On détermine ce « *nombre unitaire* » dans plusieurs régions de la préparation de foie et sur différentes coupes. La moyenne de ces « *nombres unitaires* » fournit le « *nombre moyen* ».

Le champ microscopique est défini par un objectif Leitz n° 60 et oculaire $\times 15$. Dans le cas de la cortisone, le nombre moyen obtenu dans le foie du Chien est de 48. Elle a été établie avec la réaction de métachromasie globale, sur des coupes identiques, de même épaisseur et de volume semblable. Nous supposons ici que leur teneur en mastocytes sera sensiblement la même dans les coupes sériées soumises à la détection par les réactions précitées.

Les nombres donnés par les diverses réactions sont résumés comme suit :

Métachromasie globale.	48
Métachromasie acide.	35
P. A. S. (I).	27
P. A. S. (II).	15
P. A. S. (III).	5

Le rapport héparine monosulfurique/mucine + glycoprotéine = 4.

A partir de ces résultats, on calcule le nombre de cellules renfermant les héparines et leurs différents dérivés. En remplaçant les valeurs calculées dans les relations du tableau I on trouve de nouveaux chiffres résumés dans le tableau II suivant :

Cellules basophiles positives pour les substances suivantes	Nombre moyen de cellules pour 3 champs microscopiques	Pourcentage des cellules rapporté à 100 cellules
Héparine trisulfurique.....	21	43,5
Héparine monosulfurique.....	4	8,5
Acide mucoïtine-sulfurique..	10	21
Acide hyaluronique.....	12	25
Mucine	1	1
Glycoprotéine	1	1

d) *Résultats.*

Dans ces résultats, nous remarquons qu'il y a une plus grande proportion de cellules à héparine trisulfurique positives, 43,5 %, par rapport aux cellules à héparine monosulfurique, 8,5 %, et par rapport aux autres substances moins condensées.

Cette méthode approximative d'appréciation des quantités de substances réparties au niveau des granulations des basophiles n'avait à l'origine, dans notre esprit, qu'un but spéculatif : permettre d'apprécier « grosso modo » les différentes proportions des dérivés élaborés à leur niveau. Ainsi établie, dans le cas de traitement cortisonique, cette méthode nous a surpris en apportant des résultats qualitatifs et quantitatifs mettant en valeur, au niveau des mastocytes du foie, une richesse plus grande des dérivés hépariniques (52 %) et un déséquilibre entre l'héparine trisulfurique et l'héparine monosulfurique surtout, et des autres éléments moins condensés, déséquilibre qui semble refléter l'action de l'hormone de la cortico-surrénale signalée par DEGOS et COTTENOT. En étudiant le rôle de la cortico-surrénale sur le stockage des mastocytes, ces auteurs ont trouvé chez le Rat que la surrénalectomie entraîne non une baisse des mastocytes, mais un changement dans la morphologie de ces derniers, qui sont dégradés, avec un cytoplasme homogène et faiblement métagénétique, et que l'injection compensatrice de cortisone suffit à les ramener à la normale.

Ces expériences de surrénalectomie et d'injection compensatrice montrent que : la cortisone provoque chez le Rat, au niveau des mastocytes, une mise en charge de granulations basophiles avec stockage à commande surrénalienne.

Ces auteurs ont démontré en outre que si chez les animaux sains et surrénalectomisés on injectait de l'héparine, le sujet normal donne une excrétion d'héparine au

bout de trente minutes, alors qu'elle est accélérée chez les animaux surrenalectomisés et l'héparine apparaît alors à la quinzième minute.

Ils concluent donc, d'après ces expériences, qu'il y a un stockage et une fixation de l'héparine au niveau des mastocytes, stockage commandé par l'hormone glucido-protidique de la surrénale.

D'après nous, ces auteurs sont les premiers à apporter une contribution physiologique de la présence et du stockage de l'héparine au niveau des mastocytes. Les expériences n'étaient pas prévues pour établir la synthèse de l'héparine, mais simplement pour une fixation et un stockage à leur niveau.

Nos recherches de détection quantitative et qualitative chez le Chien montrent, par la présence des différentes cellules positives aux réactions des composés hépariniques et leurs dérivés, qu'il y a des signes locaux de synthèse de l'héparine à différents degrés et elle se fait dans les mastocytes observés dans le foie. De plus, il existe, sous l'action de la cortisone ou de la surrénale, un stockage héparinique démontré par un nombre plus élevé de cellules ayant répondu à la réaction de l'héparine trisulfurique, par rapport aux cellules à héparine monosulfurique et autres dérivés. Le stockage est matérialisé par la numération des éléments après nos réactions histochimiques. Cette série de produits riches en substances hépariniques (52 % de cellules) sous l'action de la cortisone, montre que l'élaboration dans les granulations du mastocyte est poussée à son maximum. Le produit n'étant pas excrété, la synthèse dans les mastocytes a conduit surtout à la formation de dérivés trisulfuriques (43,5 %) au niveau des granules, aux dépens de l'héparine monosulfurique (8,5 %).

La concordance des résultats obtenus par deux disciplines différentes prend ici un réel intérêt. Elle renforce la valeur de notre méthode d'appréciation qualitative et

quantitative. Elle contribue à l'établissement de la preuve de l'élaboration de l'héparine au niveau des mastocytes et non un simple stockage, par la mise en évidence de différents degrés de la synthèse de l'héparine. Notre méthode explique alors les résultats des premiers auteurs et ceux des plus récents. Appliquée avec fruit dans le cas de la cortisone, elle peut, avec quelques précautions, permettre l'étude de divers agents endo ou exogènes pouvant avoir une action directe ou indirecte sur les mastocytes, leur métabolisme ou leur fonction. On pourra ainsi étudier leur comportement au cours des agressions expérimentales et états pathologiques afin de préciser le rôle des granulations basophiles dans l'organisme.

III

ETUDE DU COMPORTEMENT DES BASOPHILES TISSULAIRES ET SANGUINS ET DE LA SYNTHÈSE DE L'HÉPARINE

**dans les conditions voisines de la normale,
dans divers états pathologiques
et au cours d'agressions expérimentales.**

Les cellules basophiles tissulaires et sanguines contiennent, comme nous l'avons vu, à leur niveau, des dérivés hépariniques qui sont les aboutissants de la synthèse biologique au niveau des granulations des mastocytes. Cette synthèse, dans le cas normal, doit conduire à la formation de l'héparine plus ou moins condensée en radicaux sulfuriques et avec toute une gamme de produits intermédiaires, comme l'acide mucoïtine-sulfurique, l'acide hyaluronique ou certaines mucines.

L'héparine est un anticoagulant, elle maintient la fluidité du sang en neutralisant certaines protéines intervenant dans la coagulation : pouvoir antithrombique, pouvoir antithromboformateur. Par son action sur les protéines, confirmée par son caractère acide, l'héparine peut agir sur les substances formées par les protéines en donnant des

complexes plus ou moins dissociables, influencer secondairement en inhibant les ferments et en les protégeant. Elle inhiberait les ferments protéolytiques comme la trypsine, les tryptases. Elle peut inhiber aussi l'action des hyaluronidases qui dépolymérisent l'acide hyaluronique et l'acide mucoïtine-sulfurique des tissus conjonctifs et collagènes. De ce fait elle les protégerait contre toute atteinte et favoriserait la production de ces dernières substances. L'héparine peut, par ses constituants soufrés, influencer les collagénases en les neutralisant et favorisant la protection du tissu collagène.

Dans le sang, l'héparine peut neutraliser le complément qui est une substance protéique et par ce fait interférer dans une certaine mesure avec les phénomènes de l'immunité.

L'héparine peut également neutraliser l'histamine en protégeant l'organisme du choc anaphylactique. Les pharmacodynamistes ont pu déceler au niveau des mastocytes une quantité énorme d'histamine, 1.000 μ g par gr. de tissu. Ils ont pu préciser dans des conditions expérimentales définies que 1 mg. d'héparine peut capter 1 μ g. d'histamine.

Mais l'héparine peut aussi avoir un rôle par ses constituants :

Par les *groupements sulfuriques* et la glucosamine, elle peut fixer les colorants basiques ou des substances chimiques de type basique et les précipiter.

Par l'*acide glycuronique* contenu dans sa molécule, ainsi que les radicaux acétiques et sulfuriques, donner lieu à des phénomènes de détoxication par glycuroconjugaison, acétylation, sulfoconjugaison, qui sont les processus principaux de l'élimination des substances toxiques de l'organisme.

Par l'*acide mucoïtine-sulfurique*, substance du type mucine comme les mucines de la paroi gastrique, elle peut

protéger les tissus contre les agents irritants et aussi contre l'histamine. (Quand on injecte l'histamine, la sécrétion gastrique est augmentée).

Par l'*acide hyaluronique* de forte viscosité, qui peut limiter la diffusion des métabolites des toxines, ou des produits toxiques, et qui, par sa nature, peut attirer sur lui les mucases, les polysaccharidases, les enzymes mucolytiques et les enzymes dépolymérisants, l'héparine, en se dégradant, peut protéger, remplacer, fournir la substance nécessaire à la formation du ciment inter-cellulaire et limiter l'effet nocif de certains enzymes comme les hyaluronidases microbiennes.

Les dérivés hépariniques et leurs sous-produits au niveau des éléments basophiles du sang et des tissus leur confèrent un rôle important. A l'état normal ils sont peu nombreux dans l'organisme, ils peuvent varier dans certaines conditions physiologiques, mais surtout ils augmentent au cours de certaines manifestations pathologiques.

Dans le sang et la moelle, les basophiles sanguins sont rares, 1 à 2 %, leur nombre se trouve augmenté : dans les polycythémies essentielles, la leucémie myéloïde, le cancer secondaire, au cours des états allergiques, des irritations médullaires et ostéo-médullaires chroniques, des infections des cirrhoses hépatiques, ictères hémolytiques, anémies hémolytiques, anémie de Marchiafava, anémies aplastiques, etc...

Dans les tissus les mastocytes sont augmentés au cours de conditions physiologiques : jeûne, hibernation, où la circulation est ralentie ; ils sont augmentés dans les anomalies globulaires constitutionnelles : anomalie de Pelger-Huet, d'Adler, de May-Heglin, dans des troubles de la coagulation sanguine, dans les atteintes de la perméabilité capillaire. Il en est de même dans les phénomènes de choc, dans les agressions par stress, les états inflammatoires, certaines manifestations allergiques cutanées. Cette élévation est observée aussi au cours des lésions organi-

ques par atteinte du tissu conjonctif et du mésenchyme, par destruction, dégénérescence, atrophie, inflammation, infiltration, métamorphisme, hyperplasie et surtout au cours des affections prémalignes ou malignes, qu'elles soient aiguës ou chroniques, généralisées ou circonscrites ; on l'observe enfin au cours d'agressions expérimentales par différents agents exogènes ou endogènes, comme : 1^o les *produits chimiques* qui provoquent des chocs, états d'allergie, états toxiques ; 2^o les *produits vitaminiques* dont l'excès provoque la polymérisation de substances du type héparinique, et dont la carence provoque soit des dépolymérisations de substances collagènes, mucopolysaccharidique, soit des altérations du tissu conjonctif ; 3^o les *hormones* qui, par leurs effets sur le métabolisme des hydrates de carbone ou des protéines, agissent sur les mastocytes (cortisone, A.C.T.H., œstrogènes, hormones thyroïdiennes, testiculaires) ; 4^o les *substances chimiques anti-hormones* (thiourée, coumarine) et 5^o les *facteurs physicochimiques* comme les rayons X, les agents anti-cancérigènes chimiques, les dérivés radio-actifs.

Les différents agents qui font varier le nombre des mastocytes et basophiles sanguins sont très nombreux. Aussi, nous ne les étudierons pas tous. Nos recherches expérimentales seront limitées à des conditions déterminées.

L'étude des basophiles du sang a été faite au cours de chocs peptoniques, de manifestations allergiques de type aigu et surtout chronique. Elle a été poursuivie dans les états paranormaux comme les cirrhoses hépatiques légères, les irritations médullaires et dans les états pathologiques, au cours de leucoses d'évolution chronique.

Au cours de chocs peptoniques et allergiques, il y a une augmentation de l'héparine dans le sang et une diminution des granulations des leucocytes basophiles du sang. Au cours des injections de ces mêmes substances, donnant des chocs, mais administrés à dose plus faible et de façon chronique, nous avons observé chez la Souris et le Rat

une augmentation des basophiles sanguins, en même temps qu'une élévation des mastocytes tissulaires.

Dans les états normaux et les états proches de la normale, comme dans les cirrhoses hépatiques au début, avec ou sans ascite, ou dans les irritations médullaires, on observe une légère augmentation des basophiles. Dans ces cas la synthèse de l'héparine est perturbée par ces affections, elle aboutit pour une part à l'acide héparine-mono-sulfurique et pour une autre part à l'acide chondroïtine sulfurique. La sulfonation, au niveau des mastocytes, bien que troublée, est encore possible. L'acide hyaluronique peut être présent au niveau d'un certain nombre de granulations des basophiles du sang périphérique.

Au cours de leucose d'évolution chronique confirmée prise dès le début, et avant tout traitement, nous avons pu observer au niveau des éléments de la moelle et du sang périphérique une intrication des réactions de l'héparine et de l'acide hyaluronique avec une réponse plus nette pour ce dernier.

Les formes jeunes des éléments de la *moelle* présentent de grosses granulations, irrégulières, dilatées, donnant des vésicules métachromatiques de nature hyaluronique.

Les formes plus évoluées possèdent des granulations de taille moyenne, périphériques ou juxtanucléaires de nature héparinique assez labile.

Les éléments du *sang circulant*, d'allure jeune, montrent encore des granulations de nature hyaluronique. Ceux d'apparence plus évoluée en possèdent moins. Leurs granulations donnent les réactions positives de type héparinique associées à celle d'une substance partiellement dépolymérisable par la hyaluronidase testiculaire et peu sensible à la hyaluronidase bactérienne. Ce produit semble être, selon nous, soit de l'acide chondroïtine-sulfurique, soit de l'acide mucoïtine-sulfurique, reconnu sensible depuis à l'action de la hyaluronidase testiculaire. Ces résultats montrent que, dans la leucose d'évolution chronique, la sulfonation, qui transforme l'acide hyaluronique en héparine,

contrairement à ce qui a été observé dans les états leucémiques aigus, est encore possible, mais elle se fait cependant avec un trouble assez marqué, net surtout au niveau des éléments jeunes de la moelle. Par contre, dans les leucémies à basophiles, la sulfonation, d'après ASTALDI et coll., n'est plus possible, et la synthèse des produits hépariniques s'arrêterait à l'acide hyaluronique.

De l'ensemble de nos recherches sur les granulations basophiles des éléments du sang et de la moelle on peut dire que, dans le sang normal, la synthèse héparinique à leur niveau peut encore parvenir jusqu'au stade trisulfurique, mais dans le cas de la cirrhose, des irritations médullaires chroniques, des états paranormaux et enfin des leucoses d'évolution chronique, la sulfonation, bien que gênée, est encore possible ; cette synthèse aboutit pour une part à l'acide héparine-monosulfurique et, pour une autre part, à l'acide mucoïtine-sulfurique seulement. Dans les leucémies à basophiles, par contre, elle s'arrêterait à l'acide hyaluronique.

L'étude des mastocytes ou basophiles tissulaires a été poursuivie dans les tissus sous-cutanés, dans les différents organes et glandes endocrines de la Souris et du Rat. Nous avons distingué dans un premier cas les chocs peptoniques et anaphylactiques importants, provoqués par injection massive de produits et dans un deuxième cas les irritations chroniques, les petites inflammations, les états d'allergie et de sensibilisations cutanées mineurs, les petits traumatismes répétés dus à l'introduction sous-cutanée de substances irritantes, toxiques, médicamenteuses, allergisantes, sans modification notable de la coagulabilité sanguine. Dans ces dernières agressions nous avons pu noter une réponse des Mastzellen plus nette. Ils élaborent des héparines, plus condensées, plus acides ; en même temps ils forment des produits de dégradation ou des produits intermédiaires pour lutter activement contre les facteurs d'agression exogène et même endogène comme l'histamine. Il apparaît comme vraisemblable que l'héparine,

par ses produits de dégradation, radicaux sulfuriques, glycuroniques et acétylés serve surtout à la détoxication de l'organisme. On peut concevoir qu'au cours des chocs importants les Mastzellen puissent libérer en bloc leurs produits hépariniques élaborés au niveau des granulations. Ceci explique le peu de granulations ou leur diminution au niveau des lésions observées au cours des chocs peptoniques et allergiques importants, ainsi qu'au cours de lésions cutanées par les produits toxiques (métalliques ou médicamenteux) ou allergisant surtout dans les parties centrales de la lésion, tandis qu'un peu plus loin de cette zone où l'action nocive est moins importante, les Mastzellen sont plus abondants et ne libèreraient pas toutes leurs granulations hépariniques, mais dégraderaient ces dernières d'une façon plus lente pour donner les produits nécessaires à la détoxication de l'organisme et, selon les besoins, aider à l'élimination de ces substances toxiques.

Nous avons poursuivi ensuite l'étude des mastocytes sous l'effet des agressions par les facteurs hormonaux, en particulier de l'A.C.T.H. et de la cortisone. La cortisone, hormone glucido-protidique de la cortico-surrénale, est, on le sait, un facteur puissant qui modifie le nombre des mastocytes. Elle possède une action locale qui fait élever le nombre de ces éléments dans le tissu sous-cutané à son point d'injection. Elle possède aussi une action générale sur les mastocytes du tissu conjonctif, de divers organes et glandes endocrines. Cette action à distance sur les mastocytes des tissus a été étudiée par de nombreux auteurs. Les résultats plus ou moins discordants nous ont incité à étudier l'action de cette hormone au niveau des mastocytes tissulaires. Il nous a paru utile de préciser cet effet en recourant à de fortes doses de cortisone pendant un temps prolongé. Nous l'avons cherché sur un matériel d'expérience que nous connaissons bien pour l'avoir étudié avec HÉDON et ses collaborateurs, en particulier sur le Chien. La cortisone a provoqué chez cet animal des modifications histologiques des

organes ainsi qu'une élévation du nombre des mastocytes au niveau du tissu sous-cutané, des organes comme le foie, le pancréas et les reins, ainsi que des glandes endocrines : surrénales, thyroïde et hypophyse. L'effet métabolique de la cortisone agit dans l'organisme surtout sur le métabolisme des hydrates de carbone et des protéines du tissu conjonctif, de la peau, des organes et des glandes endocrines. Elle se manifeste encore sur les mastocytes par ses effets métaboliques primaires et secondaires. Les altérations du tissu conjonctif et les modifications sont peu visibles avec les colorations ordinaires et elles sont plus visibles avec nos réactions histochimiques. La cortisone agit également sur les fibres des trames conjonctives et les cellules des organes. Cet effet paraît être surtout dominé par l'action métabolique de la cortisone sur les glucides et les protides. Ces dernières substances sont souvent en rapport avec les dérivés hépariniques des mastocytes augmentés de nombre. L'effet général de cette hormone sur les tissus ou sur les mastocytes peut être contre-balançé dans une certaine mesure par les agents antagonistes, en particulier les hormones existant dans l'organisme et qui, de par leur action propre sur les mastocytes, interfèrent avec l'action de la cortisone pour donner des résultats différents au niveau des organes et des glandes.

Dans le foie du Chien, la cortisone a provoqué une élévation des mastocytes en même temps qu'une altération des cellules parenchymateuses au fur et à mesure de l'atteinte hépatique. La cortisone agit sur le métabolisme des protéines dont la synthèse est perturbée. L'altération des cellules hépatiques de la zone médiolobulaire devenues hydropiques, vacuolaires, hypertrophiées, démontre son effet. La substance protidique fond et fait place à une surcharge glycogénique par néoglucoformation et par transformation de ces substances en lipides. Les mastocytes sont également augmentés de nombre en même temps qu'apparaît l'atteinte des protéines sous l'effet de la cortisone. Les mastocytes ont été démontrés qualitativement et

quantitativement dans le chapitre précédent, comme des cellules génératrices d'héparine condensée et de substances polysaccharidiques acides actives sur les protéines. L'héparine s'unirait aux protéines pour les protéger contre l'effet de l'hormone par formation de complexes moins dissociables, cette action protectrice peut, dans une certaine mesure expliquer l'augmentation des mastocytes au niveau du foie et contribuer à la notion du rôle des mastocytes dans la défense de l'organisme dans tous les troubles du métabolisme des protéines au profit des glucides et des lipides, du fait que l'hormone s'attaque aux tissus conjonctifs ou aux cellules parenchymateuses. Entrevu sous cet angle, on comprend alors qu'au niveau du pancréas et du rein du Chien, peu sensibles à la cortisone en général, il n'existe pas dans leur parenchyme ou dans leurs trames conjonctives une élévation des mastocytes.

Au niveau des glandes endocrines qui possèdent leurs hormones propres pouvant s'opposer à l'effet de la cortisone, c'est le cas pour l'hypophyse, la thyroïde et les surrénales, l'élévation du nombre des mastocytes est en rapport avec l'antagonisme ou la réponse de ces hormones.

Sous l'effet de la cortisone, la *cortico-surrénale* du Chien est mise au repos, dans la région de la fasciculée et de la réticulée. La réticulée est tassée ou affaissée et congestionnée. De même au niveau de la partie médiane de la fasciculée, les spongiocytes sont turgescents et vacuolaires dans la zone proche de la glomérulaire, les cellules au repos sont aplaties et tassées les unes sur les autres. La cortisone respecterait les cellules de la glomérulaire, et c'est justement au niveau de cette zone qu'on trouve fréquemment des mastocytes ; par contre, elle provoquerait à ce niveau et dans les régions voisines, comme la capsule périphérique, une altération légère de la trame conjonctive. La présence concomitante des mastocytes et de cette altération démontre l'effet catabolisant de la cortisone sur les protéines en provoquant une altération de la trame conjonctive avec épaissement réactionnel de cette dernière

D'une manière générale, la cortisone provoquerait dans la corticosurrénale et surtout dans les zones internes une diminution des mastocytes, conformément aux observations de PATT et STEWARD qui remarquent que la cortisone possède une action inhibitrice sur les mastocytes de la peau embryonnaire en culture de tissus, elle serait aussi conforme à l'observation de ASBOE-HANSEN qui voit de même une modification des mastocytes par vacuolisation cytoplasmique, coalescence des granules et irrégularité des contours cellulaires. Nos observations au niveau de la surrénale confirmeraient les faits observés par CAVALLIERO et coll. (1951), STUART (1951), FULTON, MEYNARD (1953) et par BARKER (1953) sur l'action de la cortisone. Ils ne trouvent pas, au niveau des surrénales, comme ASBOE-HANSEN, d'élévation des mastocytes sous l'action de la cortisone ; nous avons observé seulement une élévation légère dans la portion périphérique (capsule conjonctive et région proche de la glomérulaire).

Au niveau de la *thyroïde*, sous l'effet de fortes doses de cortisone, nous avons observé au cours de nos recherches histochimiques une certaine mise au repos de la glande avec accumulation dans les vésicules devenues grosses et volumineuses, et une diminution des mastocytes par rapport aux témoins qui d'ailleurs ne présentent pas, à l'état normal, une grande richesse en mastocytes. Cette raréfaction des mastocytes semble coïncider avec l'accumulation de l'hormone thyroïdienne dans les vésicules de la thyroïde sous l'action de la cortisone. Cette diminution est confirmée par les observations de ASBOE-HANSEN, qui a vu au cours de thyroïdotoxicose, une baisse de l'acide hyaluronique au niveau des mastocytes, qui deviennent rares et pauvres en granules. Elle est encore appuyée par les observations d'ARVY et GABE qui montrent que l'injection de substance antithyroïdienne comme la thiourée provoque une augmentation des mastocytes chez le Rat.

Au niveau de l'hypophyse on sait, avec SPRAGUES, que la cortisone possède un effet antagoniste sur les hormones du lobe antérieur en freinant la sécrétion des stimulines anté-hypophysaire, ce qui retarde ou arrête, chez les sujets jeunes, la croissance. On sait, en outre, que la cortisone possède un effet antagoniste des hormones du lobe postérieur en particulier de l'hormone antidiurétique. Nos observations de l'hypophyse révèlent dans le lobe antérieur un virage avec augmentation des cellules acidophiles, en même temps qu'une baisse des mastocytes à ce niveau.

Dans le lobe postérieur de l'hypophyse, il y a également une disparition ou une diminution très forte des mastocytes par rapport au témoin.

Cette diminution aux deux niveaux de cette glande endocrine paraît être le reflet local de l'action inhibitrice de l'hormone sur les stimulines anté-hypophysaire et de l'hormone antidiurétique du lobe postérieur. Dans cette glande, on n'observe pas d'atteinte visible des trames conjonctives ou vasculaires.

Au cours de notre étude sur l'effet de la cortisone à forte dose, il semble se dégager une notion importante : que l'effet de la cortisone sur les mastocytes et sur le tissu conjonctif et vasculaire est en rapport étroit avec l'action métabolique de la cortisone sur les protéines, en particulier sur celles des substances collagènes et des substances fondamentales. La présence des mastocytes dans nos expériences est liée le plus souvent à une atteinte des protéines.

De tous les résultats obtenus au cours de nos recherches, on peut se demander si les basophiles tissulaires et sanguins n'ont pas une certaine parenté. Ils dérivent du mésoderme, du mésenchyme réticulaire, puis des cellules souches de la lignée des basophiles tissulaires et des cellules souches de la lignée sanguine, et se transforment au

cours de l'évolution ontogénique, soit directement en cellules basophiles selon les théories pluralistes, soit indirectement en passant par les hémocyto blasts ou les leucoblastes. Les différences de forme et de détail des éléments terminaux ne sont que la traduction de leur degré de maturation dans les différents organes ou milieux où ils se trouvent et où se produira la maturation, mais, ce qui les réunit, c'est surtout leur origine et la différenciation cellulaire de type génétique vers la basophilie. Cette transformation serait irréversible et l'élaboration de la substance métachromatique avec un cycle de synthèse fait leur unité. Cette unité consiste dans le fait que les cellules des deux lignées basophiles sont capables d'élaborer des substances pré et hépariniques et ne diffèrent que par leur degré de maturation. Elles ont la possibilité d'évoluer vers la différenciation et vers l'élaboration de substances métachromatiques, sans doute par acquisition d'équipement enzymatique, ce qui les fixerait. Cette acquisition les empêche alors de revenir en arrière, comme le prouve la culture des tissus : les mastocytes en culture continuent à élaborer leurs granulations métachromatiques alors que tous les autres éléments cellulaires ont disparu.

Cette unité liée à leur origine et à leur caractère de différenciation vers l'élaboration de substances métachromatiques les assemble fonctionnellement et l'on conçoit qu'ils puissent « moduler », dans une lignée comme dans l'autre. Les Mastzellen peuvent, dans certaines conditions, pénétrer dans la moelle et dans le sang, et les cellules sanguines peuvent aussi, au même titre, émigrer dans les tissus.

Cette différenciation vers la basophilie ferait qu'ils se comportent de manière identique, bien que de forme nucléaire différente et de tailles différentes. Ces détails sont plutôt liés à leur maturation dans les milieux où ils se trouvent. Les mastocytes et les leucocytes du sang, différenciés et orientés vers la fabrication de substance métachromatique, diffèrent légèrement entre eux par une

élaboration plus ou moins poussée de substance de type héparinique de caractère très acide et ayant une affinité certaine pour les protéines. Dans les conditions pathologiques et au cours d'agressions expérimentales, leur présence est en effet souvent liée à la destruction des molécules protéiques ou même nucléiques cellulaires, avec perturbation du métabolisme et libération anormale de protéine. Les basophiles du sang dans leur domaine peuvent augmenter aussi de nombre dans une certaine mesure pour neutraliser les agressions et l'excès de protéine dû aux phénomènes lésionnels métaboliques, mécaniques, physiologiques ou autres qui déterminent à la longue une perturbation dans le mécanisme de la synthèse.

L'apparition des basophiles tissulaires observée au cours des agressions expérimentales nous paraît également liée à la conservation de l'organisme et à sa défense contre les stress importants, les états pathologiques et les agressions de type chronique ou inflammatoire, dans lesquels la synthèse de l'héparine et ses produits sous-jacents serviraient à protéger l'organisme contre des agents pathogènes ou agressifs. D'autres fois cette synthèse est perturbée ou arrêtée à l'un de ses stades (sulfonation), mais dans certains cas la synthèse est exaltée et la réaction des mastocytes, dans un excès de réponse, peut aussi dépasser son but et amener une atteinte dans le mécanisme de la défense de l'organisme en enrayant l'immunité, par la précipitation du complément du sang ou bien encore en inhibant l'hémostasie.

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail nous avons examiné le problème posé par les mastocytes et les basophiles du sang dans leur rapport avec la synthèse héparinique. Pour beaucoup d'auteurs, les basophiles sécrèteraient de l'héparine ; pour d'autres, la synthèse de l'héparine à leur niveau n'est pas encore prouvée. Bien des questions restent en suspens à cause de l'imperfection des techniques de détection.

Ayant depuis 1952 étudié avec mon Maître, le professeur J. TURCHINI, les basophiles du sang et des tissus, je me suis efforcé, grâce à nos méthodes histochimiques nouvelles plus complètes, d'apporter une contribution à la solution du problème.

Pour faciliter la compréhension de cette question ardue, j'ai entrepris l'étude des basophiles en examinant leur origine, leur développement, leur différenciation, leur maturation. Puis j'ai rassemblé brièvement les acquisitions biologiques et chimiques récentes sur l'héparine et sur différentes substances pouvant se trouver en rapport avec elle, qui sont pour une part les dérivés hépariniques et ses sous-produits et, pour une autre part, diverses diastases ou substances biochimiques comme l'histamine.

Après avoir donné un aperçu historique de la détection de l'héparine, j'ai rappelé comment j'ai été amené

à proposer, avec J. TURCHINI, une méthode de détection qualitative de l'héparine plus rigoureuse, basée d'abord sur une meilleure conservation des produits hépariniques au cours de la fixation et des manipulations ultérieures, puis sur l'emploi de toute une gamme de réactions histo-chimiques permettant de déceler les différents produits hépariniques par des réactions de groupe et de constituants de l'héparine et de ses dérivés, capable de la caractériser, de donner des renseignements sur sa structure chimique, et de la différencier de ses sous-produits.

J'ai proposé une méthode quantitative d'appréciation des héparines et ses dérivés par la numération des éléments basophiles dans des conditions définies avec un groupe de réactions choisies. Cette méthode, appliquée sur les mastocytes du Chien soumis à l'action de la cortisone, a permis de confirmer les recherches expérimentales de DEGOS et COTTENOT, qui se sont efforcés de prouver physiologiquement la présence de l'héparine au niveau des mastocytes du Rat sans apporter de preuve histo-chimique.

L'application de ces méthodes à l'étude des basophiles du sang au cours des états paranormaux (cirrhoses hépatiques) et de leucoses d'évolution chronique, montre au niveau des basophiles du sang et de la moelle une élaboration de l'héparine avec différents degrés de synthèse allant de l'acide hyaluronique à l'héparine condensée dans les cas normaux. Au cours des états pathologiques, la synthèse est perturbée, cependant la sulfonation est encore possible. Dans les états paranormaux, dans les leucoses d'évolution chronique, elle parvient pour une part à l'acide monosulfurique seulement et pour une autre part à l'acide mucoïtine-sulfurique. Dans la leucémie à basophiles elle s'arrête à l'acide hyaluronique.

Les basophiles tissulaires, sous l'action des agressions expérimentales chez la Souris et le Rat, excrètent de l'héparine en se dégranulant si on les soumet à des phénomènes de choc important peptonique ou allergique modi-

fiant leur état sanguin. Au cours des agressions moindres (traumatisme, irritation, inflammation, état d'allergie, sensibilisation mineure de type chronique) par des toxiques, produits chimiques irritants ou sensibilisants, les mastocytes du tissu sous-cutané des animaux traités se comportent de deux façons : 1^o ils libèrent leur héparine et disparaissent au centre des lésions ; 2^o à la périphérie ils augmentent en nombre et se comportent comme des éléments de défense de l'organisme grâce aux composés de l'héparine, pour détoxiquer les tissus par la sulfo-conjugaison, la glyeuro-conjugaison ou l'acétylation.

Chez le Chien, soumis à l'action de la cortisone à forte dose, les mastocytes sont augmentés de nombre avec stockage de l'héparine trisulfurique dans le foie, organe le plus touché par la cortisone. Il existe dans les cellules du foie une néogluciformation et une production de lipides. Il n'y a pas par contre de modifications sensibles du nombre des mastocytes au niveau du pancréas et dans le rein resté encore normal, mais infiltré de graisse. Leur nombre est diminué, par contre, dans l'hypophyse, la thyroïde et dans la cortico-surrénale, sauf dans la glomérulaire où les mastocytes sont très légèrement supérieurs en nombre aux témoins.

La synthèse héparinique au niveau des granules des mastocytes dans le foie est poussée au plus haut point sous l'action de la cortisone (52 %), elle est confirmée par le déséquilibre entre l'héparine trisulfurique, (très augmentée (43.5 %), par rapport à l'héparine monosulfurique, qui est abaissée (8.5 %) et aux autres produits moins condensés.

Cette élévation des mastocytes est concomitante de l'altération des protéines. Là où il n'y a pas d'altération cellulaire ou conjonctive on note peu de variations, comme dans le pancréas et le rein ; elle est nulle ou diminuée dans les glandes endocrines comme la thyroïde, les surrénales et l'hypophyse, car les hormones sécrétées par ces organes possèdent un effet antagoniste vis-à-vis de la

cortisone et en même temps un effet propre sur les mastocytes.

De l'ensemble de mes recherches expérimentales sur les mastocytes et les basophiles du sang, il résulte qu'il existerait surtout une unité fonctionnelle entre ces deux types de basophiles par le fait qu'ils dérivent des cellules réticulaires du mésenchyme, qu'ils subissent une même différenciation spécifique de type génétique vers l'élaboration des substances hépariniques avec différentes étapes de synthèse prouvées par les réponses aux différentes réactions chimiques. Ils diffèrent entre eux seulement par les modalités de maturation conditionnées par les milieux où ils se trouvent, ce qui fait qu'ils ont des formes et des tailles légèrement différentes. Il en est de même pour la solubilité différente de leurs granulations.

Au niveau des basophiles sanguins et surtout tissulaires, il existe trois fonctions distinctes dues aux propriétés des produits hépariniques et de leurs dérivés :

1^o Une fonction dans la coagulation sanguine par effet de l'héparine sur les protéines de la coagulation.

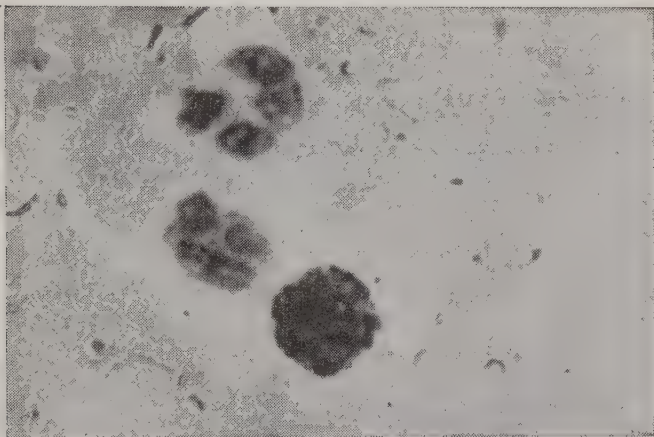
2^o Une fonction locale de défense pour détoxiquer l'organisme grâce aux composés de la molécule de l'héparine et de ses dérivés.

3^o Une fonction de protection générale de l'organisme, en particulier : 1^o la protection des protéines et de la substance fondamentale des tissus conjonctifs de la peau, de divers organes et du sang, avec lesquels les basophiles sont en rapport assez étroit ; cette protection se fait grâce à la formation de complexes héparine-protéine moins dissociables, d'où limitation des pertes — 2^o de même il y aurait protection par régularisation de la perméabilité tissulaire, par limitation de la diffusion des éléments agressifs ou toxiques pour l'organisme, grâce à la libération d'acide hyaluronique — 3^o il y aurait protection de l'organisme également par le captage des produits ou dérivés nocifs comme l'histamine.

Ces trois grandes fonctions des basophiles concourent au maintien de l'organisme en état, à la régularisation des échanges tissulaires et à la protection des éléments de défense contre l'agression. Ces éléments basophiles remplissent leur rôle en exaltant la défense, mais dans certains cas ils peuvent même dépasser leur but en enrayant les principaux systèmes de défense de l'organisme comme : l'immunité et l'hémostase.

Basophiles du sang dans les états pathologiques

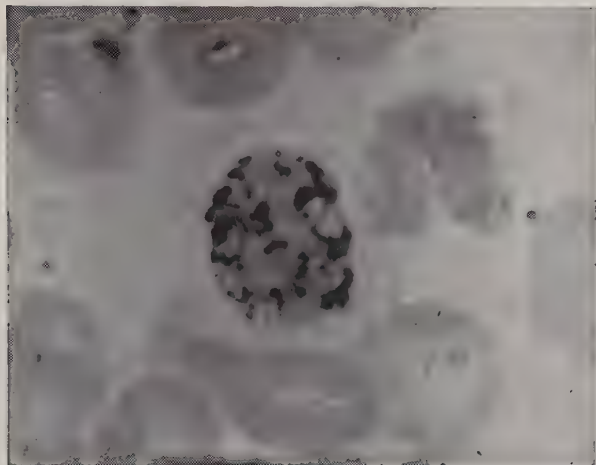
Cirrhose hépatique



Basophile dans le sang périphérique

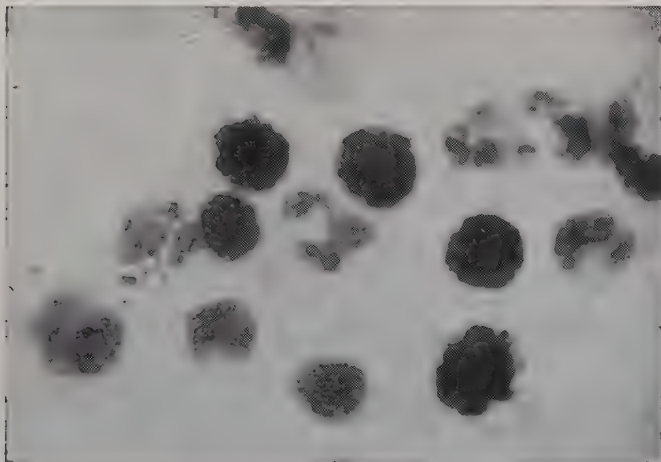
Basophiles du sang dans les états pathologiques

Leucose d'évolution chronique



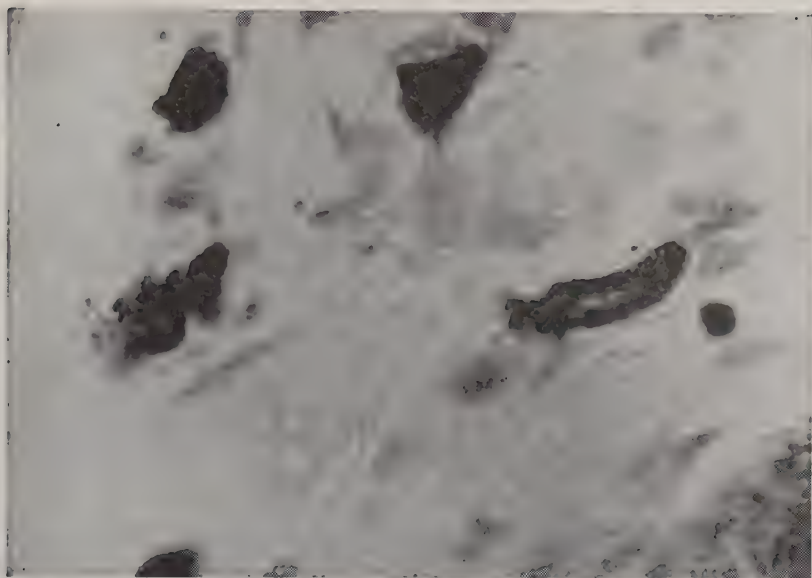
Basophile dans le *sang* périphérique

Leucose d'évolution chronique

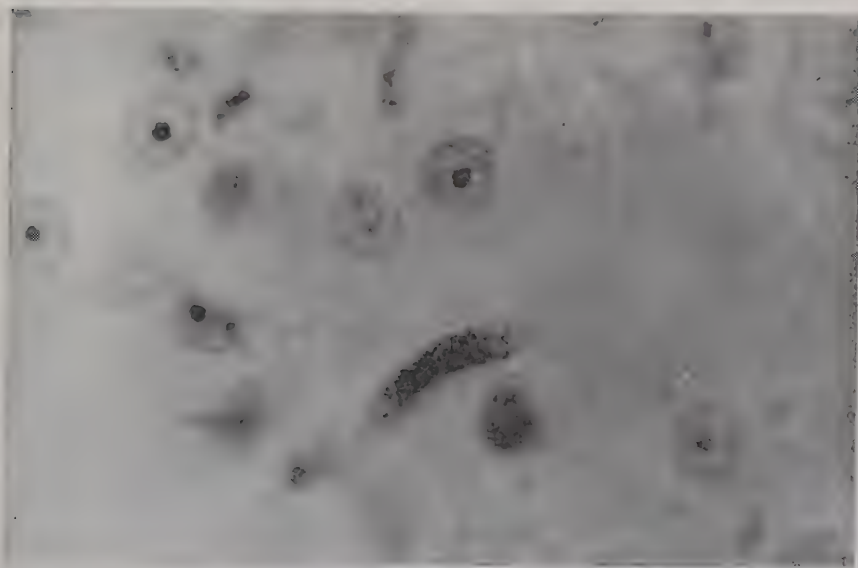


Basophiles dans la *moelle* sternale

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*

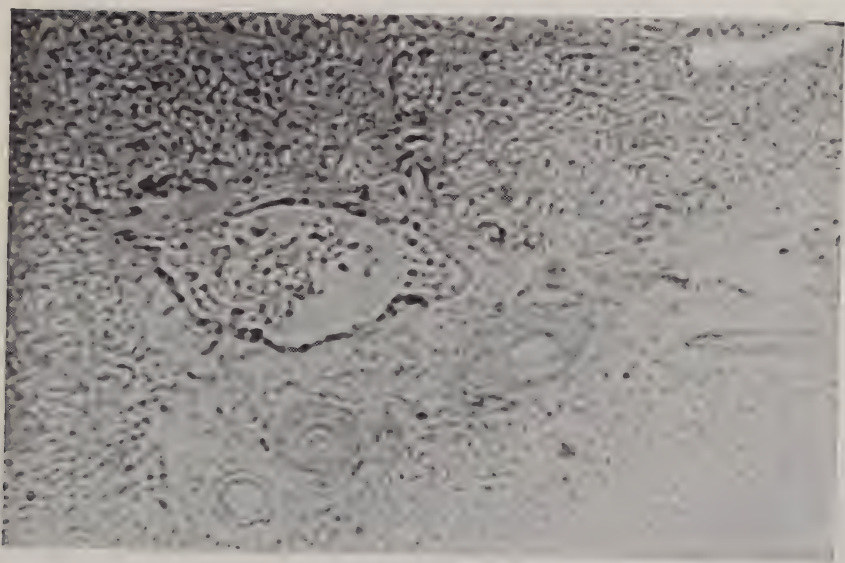


Basophiles du *tissu sous-cutané* de la *Souris* après injection de substances toxiques à faible dose (albumine).

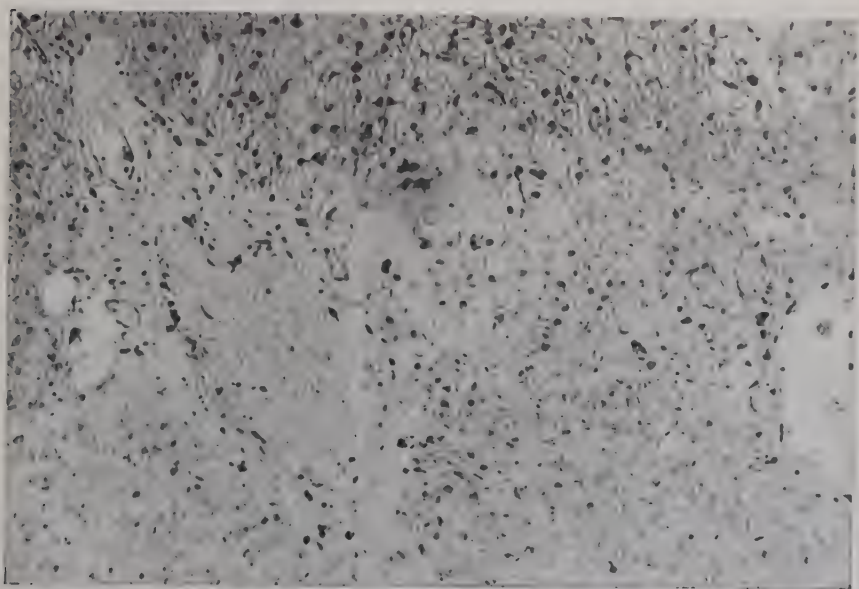


Basophiles du *tissu hépatique* du *Chien* après injection de cortisone à forte dose (détail).

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*



Chien : foie normal avec peu de basophiles

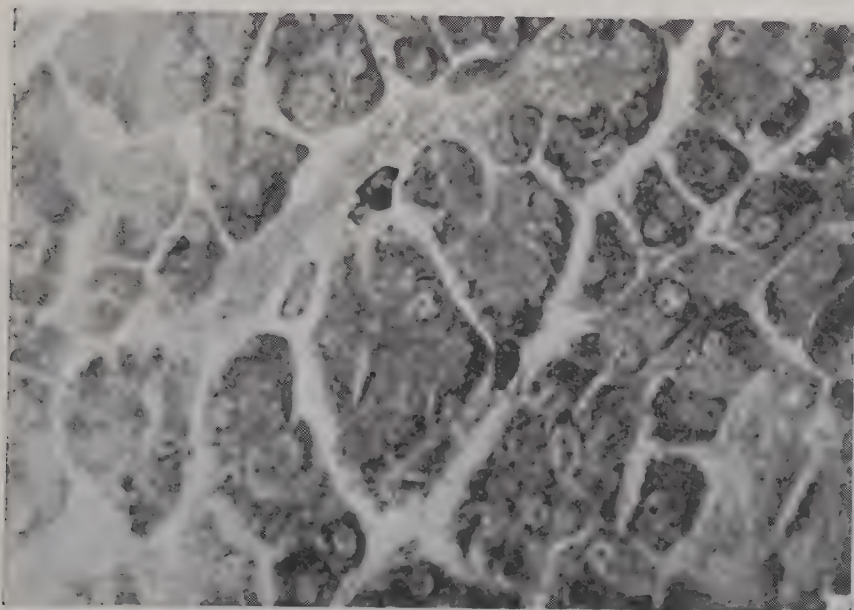


Chien : foie après cortisone, augmentation des basophiles

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*

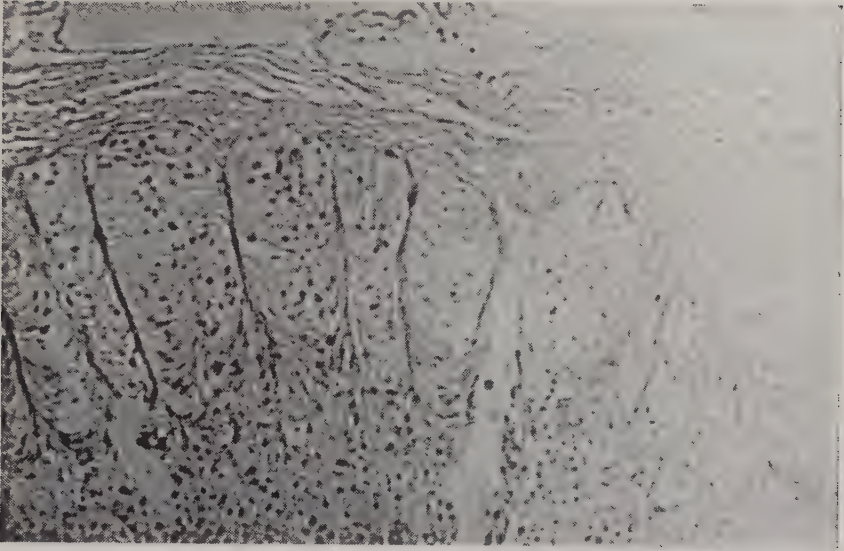


Chien : foie après cortisone, augmentation des basophiles

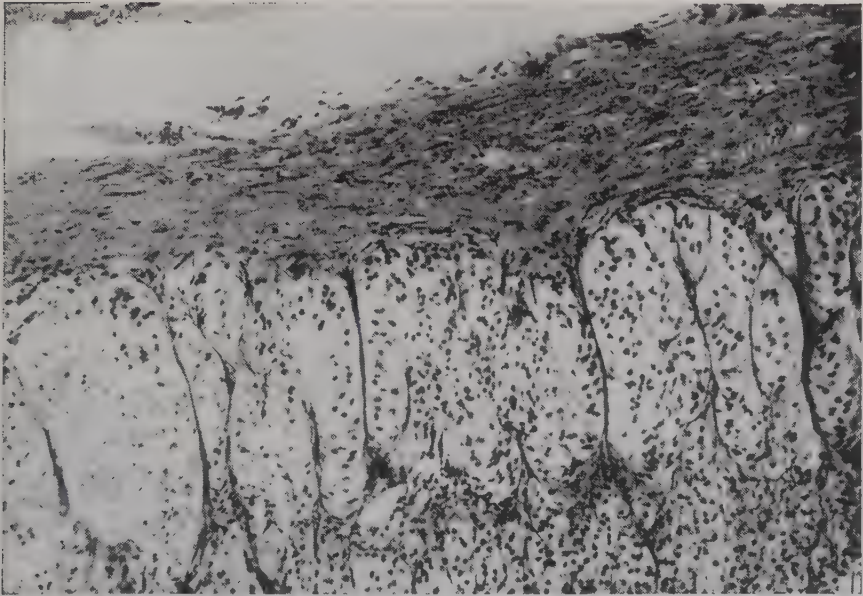


*Chien : pancréas après cortisone
Les basophiles ne sont pas augmentés*

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*

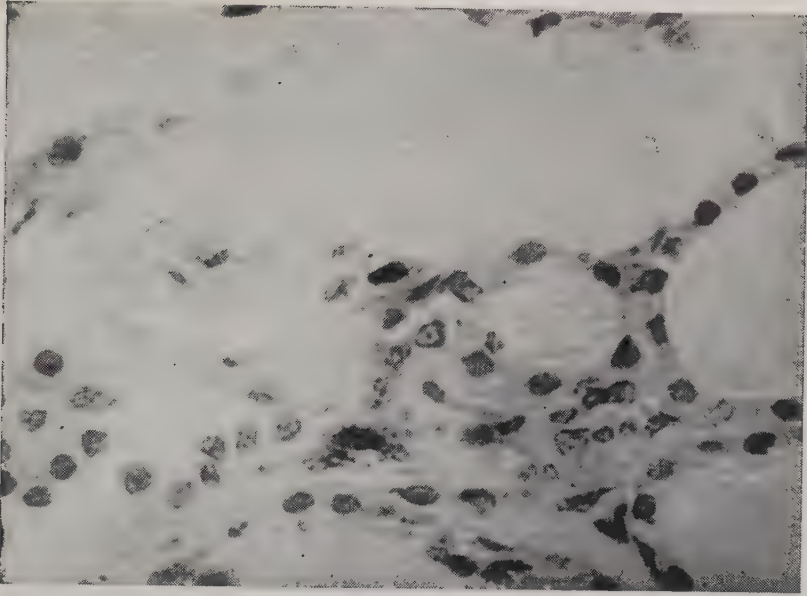


Chien : cortico-surrénale normale

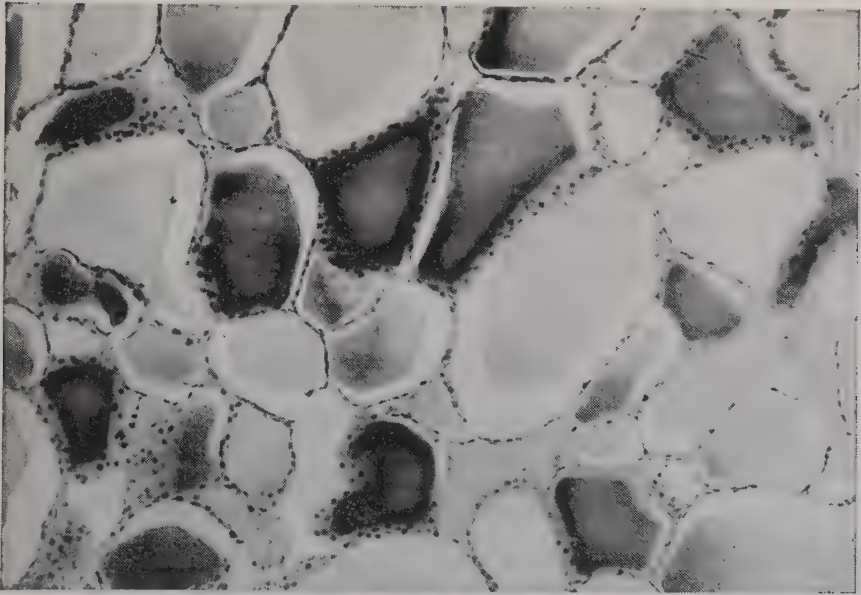


Chien : cortico-surrénale après cortisone

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*

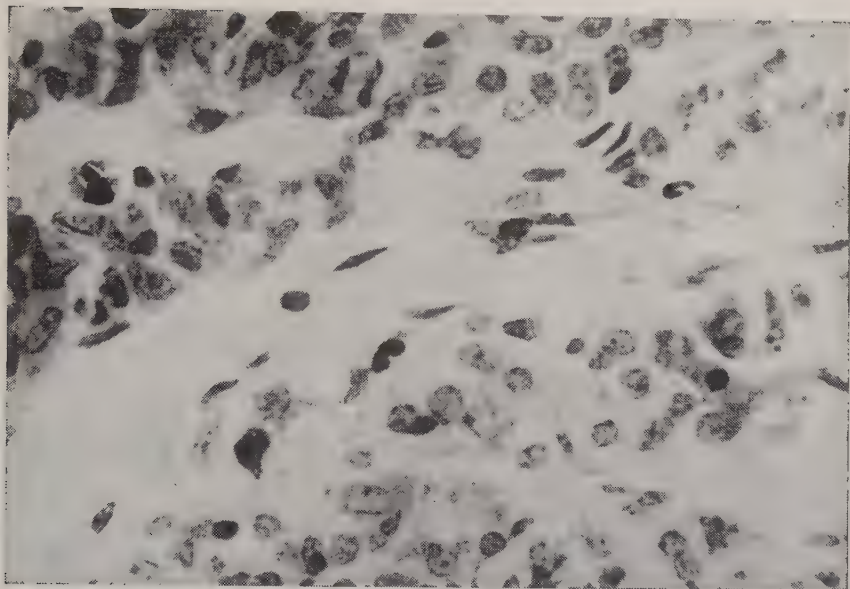


Chien : Thyroïde normale avec quelques basophiles

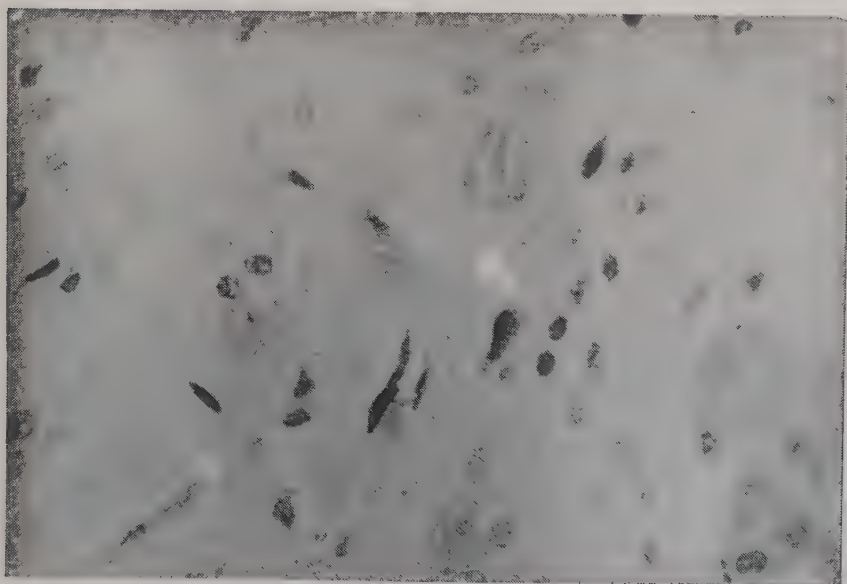


*Chien : Thyroïde après cortisone
glande au repos : rares basophiles*

*Basophiles du tissu conjonctif
au cours d'agressions expérimentales*



*Chien : Hypophyse antérieure normale avec quelques basophiles.
Disparition après cortisone.*



*Chien : Post-hypophyse normale avec quelques basophiles. Dis-
parition après cortisone.*

BIBLIOGRAPHIE

- ARVY (L.). — Les labrocytes. *Revue d'Hématologie*, t. 10, pp. 55-94, 1955.
- ARVY (L.) et GABE (M.). — Augmentation du nombre des labrocytes chez le Rat albinos après administration du thiourée. *Experientia*, t. 6, p. 23, 1950.
- ARVY (L.), BOIFFARD (J.A.) et GABE (M.). — Déterminisme de la labrocytose provoquée par des rayons X dans les organes lymphoïdes de la Souris. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 146, p. 1537, 1952.
- ASBOE-HANSEN (G.). — La « Mastzelle », facteur important dans la formation de la substance fondamentale conjonctive de la synovie. *Bull. hist. appl.*, t. 27, pp. 5-12, 1950.
- ASBOE-HANSEN (G.). — Autoradiography of mast-cells in experimental skin tumors of mice injected with radioactive sulfur S 35. *Cancer Res.*, t. 13, p. 587, 1953.
- ASTALDI (G.), RONDANELLI (E.G.) et BERNADELLI (E.). — Recherches cytochimiques sur la moelle osseuse et le sang d'une leucémie à basocytes. *Revue d'Hématologie*, t. 8, pp. 105-117, 1953.
- ASTRUP (T.), GALSMAR et VOLKERT (M.). — *Acta. Physiol. Scand.*, t. 8, p. 215, 1944.
- BAEKELAND (E.). — Influence d'implantats sanguins et fibreux sur le nombre des mastocytes et tactisme de ces cellules. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 144, p. 1005, 1950.
- BAEKELAND (E.). — Evolution des mastocytes dans la peau du Cobaye à la suite d'implantations sanguines et fibreuses. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 144, p. 1007, 1950.

- BERGSTROM (S.), JORPES (E.) and WILANDER (O.). — *Skand. Arch. Physiol.*, t. 76, p. 175, 1937.
- BESSIS (M.). — *Traité de cytologie sanguine*. Masson, édit., 1954.
- BRUSA (A.). — Contributi sperimentale alla conoscenza del significato dei Mastociti. *Biol. ital.*, t. 2, p. 758, 1949.
- BRUSA (A.). — Ulérieure contribution à la recherche de la signification fonctionnelle des mastocytes. *C. R. Ass. des Anat.*, t. 80, pp. 611-622, 1954.
- BURSTEIN (M.). — *La coagulation du sang*. Masson, édit., 1949.
- BEAUZAMY-MODAY (L.). — Etude du basophile sanguin en microscopie à contraste de phase. *C. R. Ass. des Anat.*, t. 79, pp. 709-714, 1953.
- CAZAL (P.). — Aplasie médullaire et mastocytose, V^{me} Congrès inter. Hématol., Paris, 1954.
- CHARLES (A.) and TODD (A.). — *Biochem. Journ.*, t. 34, p. 112, 1940.
- COMPTON (A.S.). — A cytochemical and cytological study of the connective tissue mast-cells. *Am. J. Anat.*, t. 91, pp. 301-329, 1952.
- CHEVALLIER (P.) et MARINONE (G.). — La leucémie à basocyte. *Le Sang*, t. 19, p. 193, 1948.
- DEGOS (R.) et COTTENOT (F.). — Physiologie du mastocyte tissulaire. Rôle de la surrénale sur le stockage mastocytaire. *Bull. Soc. franç. dermatol. et syphiligr.*, t. 60, p. 228, 1953.
- DE BRUX (J.). — Constitution histochimique de la substance fondamentale et maladies « du collagène ». *Presse médicale*, t. 59, p. 627, 1951.
- DELAUNAY (A.). — Structure et propriétés du tissu conjonctif. *Thérapie*, t. 7, p. 177, 1952.
- DELAUNAY (A.) et GUILLAUMIN (M.). — Les collagénases. *Thérapie*, t. 7, 1952.
- DELAUNAY (A.) et VOISIN (G.). — Les hyaluronidases et leurs propriétés biologiques. *Presse médicale*, t. 58, p. 29, 1950 et p. 79, 1950.
- FAVRE-GILLY (J.), BRUEL (M.), BOREL-MILHET (M.) et GARNIER (M.). — *Journées médicales*, Lyon, t. 32, p. 205, 1951.

- FRUTEAU DE LACLOS (C.), HÉDON (L.), KHAU VAN KIEN (L.), MACABIES (J.) et TURCHINI (J.). — Observation histologique sur quelques organes du Chien soumis à l'action prolongée de fortes doses de cortisone en relation avec les modifications du métabolisme. *C. R. de la Soc. de biol.*, 1955, t. 149, pp. 782-784.
- FRICK (R.). — Zur physiopathologie der Mastzellen (Heparinspeicherung und Ausschüttung). *Acta. Haemat.*, t. 4, pp. 97-109, 1950.
- GIANNICO (O.) et MARROZZA. — Les modifications des héparinocytes par le dicoumarol. *Clinica nuova*, t. 10, pp. 159-172, 1950.
- HÉDON (L.), KHAU VAN KIEN (L.), MACABIES (J.) et TURCHINI (J.). — Effet de la corticostimuline et de la cortisone sur le métabolisme du Chien normal. *Journ. de Physiol.*, t. 45, pp. 127-131, 1953.
- HOWELL (W.) and MAC-DONALD (C.). — *Bull. Journ. Hopkins Hospit.*, t. 46, p. 365, 1950.
- JACQUES (L.B.). — Héparinase. *J. Biol. chem.*, t. 133, p. 445, 1940.
- JORPES (J.). — Héparin. *Oxford, unit. Presse*, London, 1946.
- JORPES (J.), HOLMGREN (H.) and WILANDER (O.). — Über das Vorkommen von Heparin in den Gefäßwänden und in den Augen. Ein Beitrag zur Physiologie der Ehrlichschen Mastzellen. *Ztsch. fur. Mikr. Anat. Forsch.*, t. 42, pp. 279-301, 1937.
- KHAU VAN KIEN (L.). — De quelques fluorones ; leurs propriétés chimiques et biologiques, leur application à la localisation des médicaments antimonisés dans l'organisme. *Thèse doctorat d'Etat en Pharmacie*, Montpellier, 1945.
- LISON (L.). — *Histochimie et cytochimie animale*. Gauthier-Villars, édit., Paris, 1953.
- MAXIMOW (A.A.). — Les relations des cellules sanguines avec le tissu conjonctif et l'endothélium. *Ann. anat. pathol.*, t. 4, p. 701, 1927.
- MITCHELS (N.A.). — The mast-cells. *Handb. of Hematology de Downey*, Hoeber, édit., New-York, vol. I, sect. IV, pp. 232-372, 1938.
- MESSERSCHMITT (J.). — Fréquence des Mastzellen dans les frottis de moelle osseuse chez l'Homme. *Rev. d'Hématologie*, t. 1, pp. 189-197, 1954.

- MAC-MANUS (J.F.A.). — Granules of the human polymorphonuclear leucocytes. *Nature*, pp. 156-193, 1945.
- MOSINGER (M.). — Nouvelles recherches sur les corrélations entre l'appareil mastocytaire et le système neuro-endocrinien. *C. R. Ass. des Anat.*, 42^{me} réun., Paris, pp. 1066-1072, 1955.
- OLIVER (J.), BLOOM (F.) et MANGIERI (C.). — On the origin of heparin. An examination of the heparin content and the specific particles of neoplastic mast-cells. *Journ. Exp. Med.*, t. 86, pp. 107-122, 1947.
- QUICK (A.J.). — The anti-coagulants effective « in vivo » with special reference to heparin and dicoumarol. *Physiological Reviews*, t. 24, p. 297, 1944.
- ROLLEN (A.). — Acide hyaluronique et hyaluronidase. *Produits Pharmaceutiques*, t. 9, pp. 19-23, 1954 et pp. 66-89, 1954.
- SYLVEN (B.). — The cytoplasm of living tissue mast-cells in visual phase contrast. *Exptl. cell. Research.*, t. 1, pp. 492-494, 1950 et t. 2, pp. 252-255, 1951.
- SYLVEN (B.) et GLICK (D.). — Evidence for the heparine nature of the non specific hyaluronidase inhibitor in tissue extracts and blood serum. *Sciences*, t. 113, pp. 388-389, 1951.
- SYLVEN (B.), JULEN (C.) et SNELLMAN (O.). — Analysis of the native heparin lipoprotein complex including the identification of an heparin complement (cofactor) obtained from extracts of tissue mast-cells. *Biochemica et Biophysica Acta*, t. 7, pp. 98-109, 1951.
- TOTTERMAN (G.). — Are the basophilic leucocytes heparinocytes ? *Acta Medica Scand.*, pp. 130-176, 1948.
- TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Héparine et granulations basophiles. *Montpellier médical*, t. 41-42, p. 967, 1952.
- TURCHINI (J.) y KHAU VAN KIEN (L.). — Investigaciones histológicas sobre granulaciones basophilas. *Proceed. of Intern. Soc. Of. Hemato*, IV^{me} Congrès international. (Mar del Plata), 1952.
- TURCHINI (J.) and KHAU VAN KIEN (L.). — Histochemical investigation of the basophilic granules. *Proceed. of Intern. Soc. of Hemato*, IV^{me} Congrès international. (Mar del Plata), 1952.

- TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Différents degrés de synthèse héparinique au niveau des basophiles du sang normal et de certaines leucoses. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 188, pp. 2065-2067, 1954.
- TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Etude des basophiles du sang dans quelques conditions où leur nombre se trouve augmenté. *V^{me} Congrès intern. Hématol.* Paris, p. 156, 1954.
- TURCHINI (J.) et KHAU VAN KIEN (L.). — Etude histochimique des basophiles tissulaires après action massive de la cortisone. *C. R. de la Soc. de biol.*, t. 189, pp. 1623-1626, 1955.
- VALETTE (G.). — L'hyaluronidase. Propriétés physico-chimiques et biologiques. *Thérapie*, t. 7, p. 188, 1952.
- VEIL (C.). — Comportement des héparinocytes de l'écaille de poisson au cours de diverses modalités expérimentales. *J. de Physiol.*, t. 43, p. 885, 1951.
- WILANDER (D.). — Studien uber Heparin. *Skand. Arch. Physiol.*, t. 81, p. 189, 1939.
- WILLIAM (G.T.). — Tissue mast-cells in human bones marrow. *Am. J. of clin. path.*, t. 22, pp. 1039-1043, 1952.
- ZOLLINGER (H.U.). — Gewebsmastzellen und Heparin (Phasenmikroskopische Untersuchung). *Experientia*, t. 6, pp. 384-386, 1950.
-

TABLE DES MATIERES

<i>Introduction.</i>	7
 I. — <i>Généralités.</i>	 9
1° Les basophiles tissulaires.	11
2° Les basophiles sanguins.	15
3° Les produits en rapport avec le métabolisme des masto- cytes et basophiles.	20
 II. — <i>Méthodes de détection histochimique.</i>	 27
1° Historique des méthodes de détection de l'héparine.	27
2° Matériel et techniques de conservation et de détection de l'héparine et ses dérivés.	31
3° Méthode de détection qualitative de l'héparine, des dérivés hépariniques et polysaccharidiques.	40
Les réactions histochimiques de l'héparine.	41
4° Méthode d'appréciation quantitative des différentes substan- ces hépariniques et de leurs dérivés.	48
 III. — <i>Etude du comportement des basophiles tissulaires et san- guins et de la synthèse de l'héparine dans divers états pathologiques et au cours d'agressions expérimentales</i>	 59
 <i>Conclusions.</i>	 72
 <i>Clichés.</i>	 77
 <i>Bibliographie.</i>	 93

SERMENT

En présence des Maîtres de cette Ecole, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être suprême, d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime. Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ! Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

En ma qualité de Censeur de tour,
j'ai lu la Thèse ayant pour titre :

Contribution à l'étude histochimique des granulations des basophiles du tissu conjonctif et du sang. Les différents degrés de la synthèse de l'héparine et de ses dérivés, et son comportement dans divers états pathologiques, et au cours d'agressions expérimentales.

Je pense que la Faculté peut en
permettre l'impression.

Montpellier, le 20 juillet 1955

Le Professeur,
J. TURCHINI

Vu :

Montpellier, le 21 juillet 1955.

Le Doyen,
G. GIRAUD.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Montpellier, le 22 juillet 1955

Le Recteur,
R. DOUCET.

La Faculté de médecine de Montpellier déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leur auteur; qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

